



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Unidad de Biomedicina**

**“IDENTIFICACIÓN DE LA ONCO-PROTEÍNA  
TIROSINA CINASA C-ABL COMO POTENCIAL  
SUSTRATO DE PAK1”**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**TANIA REYES MENDOZA**

**Director de tesis:**

**Dr. Luis Enrique Arias Romero**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.**

**2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **ASESORES**

### **Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés**

Laboratorio de Inmunoparasitología e Inmunoregulación  
UBIMED Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

### **Dr. Roberto Eduardo López Urrutia**

Laboratorio de Regulación epigenética en tumores sólidos  
UBIMED Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

### **Dr. Eloy Andrés Pérez Yépez**

Laboratorio de Biología celular del cáncer UBIMED Facultad  
de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

### **M. en C. Olga Villamar Cruz**

Laboratorio de Biología celular del cáncer UBIMED Facultad  
de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

La vida está llena de retos y para mi uno de los retos más grandes pero a la vez más satisfactorios fue ser parte de la Universidad Nacional Autónoma de México, ya que al estar dentro de ella adquirí grandes responsabilidades que me permitieron obtener los conocimientos y habilidades necesarios para mi formación académica y profesional, así como herramientas que me ayudaron a desarrollarme en el ámbito personal.

A lo largo de mi formación he aprendido que los seres humanos no podemos permanecer aislados y siempre necesitaremos de personas que nos impulsen y ayuden a cumplir nuestras metas.

Es por ello que quiero agradecer a mis padres y a mi hermana por ser los cimientos de mi desarrollo en este gran reto, por su apoyo incondicional y la confianza que depositaron en mi para que pudiera alcanzar mis sueños, así como por todas sus enseñanzas que me permitieron llegar hasta este punto; de igual forma quiero agradecer a mi compañero de vida Octavio por su apoyo y comprensión ante este largo camino así como su amor y paciencia que me impulsaron a seguir adelante.

A mi tutor y director de este proyecto el Dr. Luis Enrique Arias Romero por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio y de poder desarrollar mi tesis bajo su dirección, así como a la M en C. Olga Villamar Cruz por la ayuda técnica brindada.

Al Dr. Eloy Andrés Pérez Yépez por ayudarme a cumplir cada objetivo de este proyecto y ser mi guía en el mismo, así como por su motivación y amistad brindada en este proceso.

A mis asesores el Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, el Dr. Roberto Eduardo López Urrutia, el Dr. Eloy Andrés Pérez Yépez y la M en C. Olga Villamar Cruz, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis por sus observaciones y sugerencias que permitieron enriquecer este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que forman parte del Laboratorio 14 por su gran apoyo y dedicación que permitieron la culminación de esta investigación.

## RESUMEN

Las cinasas activadas por p21 (PAKs) fueron las primeras cinasas activadas por GTPasas en ser identificadas. Estas proteínas desempeñan papeles muy importantes en distintos procesos celulares, incluyendo el mantenimiento de la morfología celular, supervivencia, transcripción génica, progresión del ciclo celular, apoptosis, motilidad y señalización hormonal, entre otros. Es por esto que la desregulación de esta enzima se ha relacionado con diversas enfermedades, incluyendo el cáncer.

Estudios recientes han documentado que la señalización mediada por el miembro fundador de la familia, y mejor caracterizado hasta la fecha, PAK1, es importante para la activación de vías de señalización como las de Ras/RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ $\beta$ -catenina, y así regular procesos como la progresión del ciclo celular, supervivencia, diferenciación y proliferación celular. Recientemente, ensayos de fosfoproteómica han mostrado que varias moléculas de señalización implicadas en el inicio y/o progresión del cáncer se encuentran hipofosforiladas en células de cáncer de mama deficientes de PAK1, incluyendo algunos sustratos bien caracterizados de PAK1 y también algunas otras proteínas que podrían ser reguladas directa o indirectamente por PAK1. Una de estas moléculas es la proteína tirosina cinasa no receptora c-ABL, que potencialmente podría ser un nuevo sustrato de PAK1.

En los últimos años algunos estudios han reportado que c-ABL se encuentra sobreexpresada y constitutivamente activa en algunos tumores sólidos y que esta hiperactividad está relacionada con la resistencia a la quimioterapia en células de cáncer de mama positivas al receptor a estrógenos (RE). Sin embargo, el mecanismo molecular involucrado en la activación de c-ABL en estos tipos de cáncer no es completamente entendido. En este trabajo se identificó que los residuos de Serina 16, 638, 878 y 955 son potenciales sitios de fosforilación de

PAK1 *in silico*. Proteínas recombinantes de fusión a GST, que contienen péptidos con los sitios candidatos de fosforilación, se purificaron y se utilizaron como sustrato para ensayos de cinasa *in vitro*. Los resultados del presente estudio mostraron que PAK1 puede fosforilar a c-ABL en los residuos de Serina 638 y 878. Con el propósito de evaluar una posible interacción física entre PAK1 y c-ABL en un contexto celular, se evaluó mediante Western blot la expresión de ambas proteínas en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, BT474 y de la línea celular de glándula mamaria no transformada MCF-10A como control de los niveles de expresión basal. Los resultados mostraron que en las tres líneas celulares de cáncer de mama la expresión de PAK1 es mucho mayor en comparación con la línea celular no transformada, y entre las líneas celulares de cáncer de mama, la que presenta los mayores niveles de expresión de PAK1 es MDA-MB-231, la cual es considerada la más agresiva de las tres líneas celulares utilizadas. Respecto a la expresión de c-ABL, no se detectó en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 ni BT-474; y únicamente se observaron niveles altos de expresión en la línea celular MDA-MB-231. Para validar la interacción física de c-ABL y PAK1 en células de cáncer de mama, se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación, donde se observó que ambas proteínas interactúan físicamente en un contexto celular. Estos resultados en conjunto, sugieren que la onco-proteína c-ABL es fosforilada *in vitro* por PAK1 en al menos dos residuos de Serina en las posiciones 638 y 878, y que ambas proteínas se asocian físicamente en células de cáncer de mama. En un futuro, se planea evaluar el efecto de la fosforilación de c-ABL mediado por PAK1 en la biología del cáncer de mama.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

**Figura 1.** Capacidades adquiridas en el cáncer.

**Figura 2.** Subtipos moleculares de cáncer de mama.

**Figura 3.** Activación de las PAK del grupo I y las PAK del grupo II.

**Figura 4.** Estructura molecular de la proteína c-ABL.

**Figura 5.** Activación e inactivación de c-ABL por cambios conformacionales.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de nucleótidos que codifican las serinas candidatas a ser fosforiladas por PAK1 S16, S638, S878 y S955.

### RESULTADOS

**Figura 6.** Secuencia de aminoácidos de c-ABL obtenida en la base de datos NCBI y sitios consenso de fosforilación con PAK1 obtenidos por el análisis de software Group-Based Prediction System (GPS) 3.0.

**Figura 7.** Amplificación por PCR de cada una de las regiones de c-ABL candidatas a ser fosforiladas.

**Figura 8.** Gel de Agarosa al 1% en el cual se resolvieron los productos de PCR obtenidos para la amplificación de secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias candidatas a ser fosforiladas por PAK1 S16, S638, S878 y S955.

**Figura 9.** Expresión de las proteínas recombinantes en los extractos de bacterias inducidas con IPTG.

**Figura 10.** Purificación de las proteínas recombinantes que contienen los potenciales sitios de fosforilación mediados por PAK1.

**Figura 11.** Ensayo de cinasa *in vitro* de los residuos candidatos a ser fosforilados por PAK1.

**Figura 12.** Niveles de expresión de PAK1 y c-ABL en distintas líneas celulares de cáncer de mama.

**Figura 13.** Interacción de PAK1 y c-ABL en un contexto celular.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ErbB1/EGFR:** Receptor al factor de crecimiento epidermal.

**ErbB2/HER2:** Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal.

**ErbB3/HER3:** Receptor tirosina-cinasa ErbB3.

**ErbB4/HER4:** Receptor tirosina-cinasa ErbB4.

**ER:** Receptor a estrógenos.

**PR:** Receptor a progesterona.

**CK:** Citoqueratina.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 cinasa.

**mTOR:** Diana de rampamicina en células de mamífero.

**MAPK:** Proteína cinasa activada por mitógenos.

**S6K:** p70S6 cinasa.

**EGF:** Factor de crecimiento epidermal.

**TGF- $\alpha$ :** Factor de crecimiento transformante alfa.

**AR:** Receptor a andrógenos.

**PAK:** Cinasa activada por P21.

**GBD:** Dominio de unión a GTPasa.

**AID:** Dominio de autoinhibición.

**PS:** Pseudosustrato.

**c-ABL:** Proteína tirosina cinasa ABL1.

**SH3:** Dominio con homología a Src 3.

**SH2:** Dominio con homología a Src 2.

**F-actina:** Actina filamentosa.

**G-actina:** Actina globular.

**NES:** Secuencia de exportación nuclear.

**NLS:** Secuencia de localización nuclear.

**PxxP:** Región rica en prolinas.

**RTK:** Receptores con actividad tirosina cinasa.

**GST:** Glutación S transferasa.

**µg:** Microgramos.

**µl:** Microlitros.

**mM:** Milimolar.

**µM:** Micromolar.

**MgCl:** Cloruro de magnesio.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de sodio.

**PBS:** Buffer de fosfato salino.

**KCl:** Cloruro de potasio.

**NaCl:** Cloruro de sodio.

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Bifosfato de sodio.

**KH<sub>2</sub>:** Hidruro de potasio.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Ortovanadato de sodio.

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno.

**mA:** Miliamperes.

**RT-PCR:** Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa.

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa.

**IPTG:** Isopropil β-D-tiogalactopiranosido.

**GPS:** Group-Based Prediction System.

**NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

# ÍNDICE

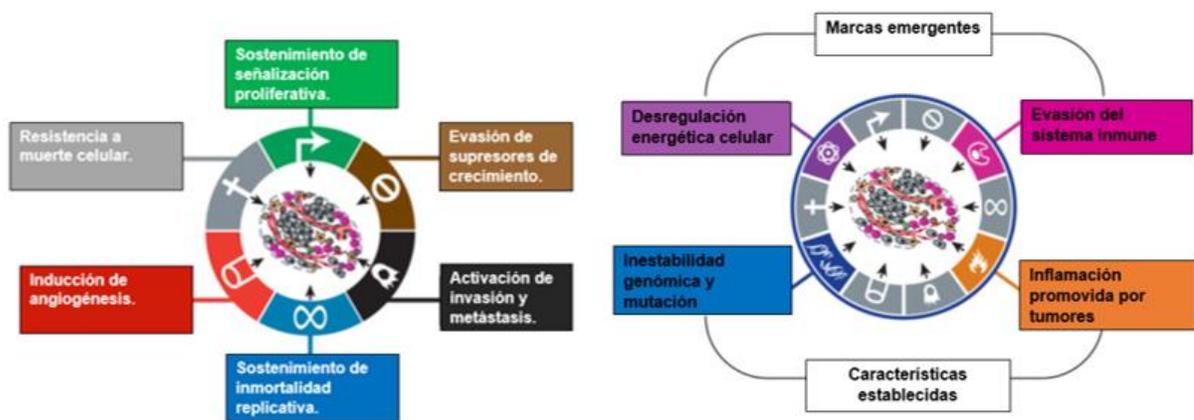
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA</b>	<b>2</b>
<b>1.2 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA</b>	<b>3</b>
<b>1.3 SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA</b>	<b>3</b>
<b>1.3.1 Luminal</b>	<b>3</b>
<b>1.3.2 ErbB2 positivo</b>	<b>5</b>
<b>1.3.3 Basal</b>	<b>6</b>
<b>1.3.4 Triple negativo</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Vías de señalización que regulan la progresión en el cáncer de mama.</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1 Vía de PI3K/Akt/mTOR</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2 Vía de las MAPK</b>	<b>9</b>
<b>1.4.3 Receptor HER2</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Vías de señalización reguladas por PAKs</b>	<b>10</b>
<b>1.6 PROTEÍNAS PAK</b>	<b>11</b>
<b>1.6.1 Activación de PAKs del grupo I</b>	<b>11</b>
<b>1.6.2 Activación de PAKs del grupo II</b>	<b>12</b>
<b>1.6.3 PROTEÍNAS PAK Y CÁNCER</b>	<b>14</b>
<b>1.7 PROTEÍNA C-ABL</b>	<b>15</b>
<b>1.7.1 Regulación de c-ABL</b>	<b>16</b>
<b>1.7.2 PROTEÍNA c-ABL Y CÁNCER</b>	<b>18</b>
<b>3. HIPOTESIS</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>21</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>21</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>6.1 Ensayos de actividad de cinasa <i>in vitro</i></b>	<b>22</b>
<b>6.2 Cultivo celular.</b>	<b>22</b>
<b>6.3 Obtención de PAK1 recombinante</b>	<b>23</b>
<b>6.4 Transfección de pCMV-6M-PAK1-L107F</b>	<b>23</b>
<b>6.5 Cuantificación de proteínas</b>	<b>24</b>

6.6 Inmunoprecipitación de PAK1 a partir de lisados celulares	24
6.7 SDS-PAGE	24
6.8 Western blot	25
6.9 Análisis <i>in silico</i> de la fosforilación de C-ABL mediada por PAK1.	26
6.10 Obtención de RNA.	26
6.11 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	27
6.12 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.	29
6.13 Clonación de c-ABL (S16, S638, S878 y S955) en el vector pGEXP6P3.	29
6.14 Determinación de colonias positivas mediante PCR de colonias.	30
6.15 Obtención de DNA plasmídico.	31
6.16 Cuantificación de DNA plasmídico.	32
6.17 Digestión de los plásmidos pGEXP6P3-c-ABL S16, pGEXP6P3-c-ABL S638, pGEXP6P3-c-ABL S878, pGEXP6P3-c-ABL S955.	32
6.18 Expresión y purificación de proteínas recombinantes GST-c-ABL-S16, GST-c-ABL-S638, GST-c-ABL-S878 y GST-c-ABL-S955.	32
6.19 Co-inmunoprecipitación de c-ABL y PAK1	33
7.1 Análisis <i>in silico</i> de la fosforilación de c-ABL mediada por PAK1	34
7.2 Clonación de los fragmentos de c-ABL que contienen los potenciales sitios de fosforilación mediados por PAK1	36
7.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes	38
7.4 PAK1 fosforila a c-ABL en los residuos de Serina 638 y 878 <i>in vitro</i>	40
7.5 Las proteínas PAK1 y c-ABL se encuentran sobreexpresadas en líneas celulares de cáncer de mama	41
7.6 PAK1 y c-ABL interactúan directamente <i>in vitro</i>	43
8. DISCUSIÓN	44
9. CONCLUSIONES	50
10. PERSPECTIVAS	50
11. LITERATURA CITADA	51
12. ANEXO	58

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma (Hanahan & Weinberg, 2000); y es el resultado de diversas causas ambientales que contribuyen a la adquisición de mutaciones que conducen a la activación de oncogenes, es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier parte del cuerpo (OMS, 2017), lo cual da como resultado el fenotipo de cáncer (Bishop & Weinberg, 1996). Recientemente se ha sugerido que la mayoría de los tumores humanos comparten un pequeño número de rasgos moleculares, bioquímicos y celulares denominados capacidades adquiridas, los cuales conducen a la transformación progresiva de células normales en derivados altamente malignos (Hanahan & Weinberg, 2011).

Inicialmente se habían documentado seis capacidades adquiridas entre las cuales se encuentran: el sostenimiento de señales proliferativas, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inducción de angiogénesis, inmortalidad replicativa, invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). Sin embargo recientemente se han incorporado otras capacidades que participan en la transformación celular: la evasión del sistema inmune, respuesta inflamatoria y la desregulación de la energía celular, estas características en conjunto nos proporcionan un marco para la comprensión de la compleja biología del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).



**Figura 1. Capacidades adquiridas en el cáncer.** Se observan las características adquiridas propuestas inicialmente y la actualización de las mismas las cuales están involucradas en el proceso de transformación celular, cada una con un mecanismo que conduce a la formación del fenotipo maligno. Editado de Hanahan & Weinberg, 2011.

## 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la incidencia y mortalidad del cáncer de mama aumentará en un 50% para 2020 (Akinkuolie *et al.*, 2016).

En América latina las mujeres menores de 45 años de edad representan hasta el 20% de los nuevos casos reportados y el 14% de las muertes causadas por cáncer de mama a nivel mundial. Existen varias explicaciones posibles para esta observación que incluyen, la estructura de la edad de la población, estilo de vida y hábitos reproductivos (Villarreal *et al.*, 2017).

En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte entre las mujeres de 30 a 45 años de edad y afecta a mujeres de todos los niveles socioeconómicos, (Knaul *et al.*, 2009). Desde el 2006 en México se ha presentado un aumento anual en los casos reportados, con una tasa de incidencia de 12 casos por cada 100.000 mujeres de 25 a 44 años de edad (Villarreal *et al.*, 2017).

## 1.2 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

Clínicamente el cáncer se puede clasificar tomando en cuenta: el tamaño del tumor, la infiltración a nodos linfáticos y la presencia de metástasis, cada uno de estos puntos permite proyectar el comportamiento clínico de las neoplasias malignas y de esta manera establecer terapias apropiadas (Cowherd, 2010); sin embargo el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea tanto a nivel morfológico como molecular, por lo cual esta clasificación no es completamente útil por ello se han establecido nuevas clasificaciones (Heng *et al.*, 2017).

La evaluación histopatológica de las características morfológicas de los tumores de mama proporciona información pronóstica para guiar la terapia; sin embargo, los análisis moleculares proporcionan más información diagnóstica, pronóstica y predictiva (Heng *et al.*, 2017). Molecularmente, los tumores de mama se pueden clasificar en cuatro subtipos intrínsecos: luminal A/B, con sobreexpresión de la proteína HER2 (ErbB2 positivo), basal y triple negativo, cada uno de estos subtipos presenta un pronóstico, y terapias dirigidas. Esta clasificación fue posible gracias al análisis de los perfiles de expresión genética de más de 200 muestras de tumores de mama (Perou CM *et al.*, 2000).

## 1.3 SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA

### 1.3.1 Luminal

Los tumores de tipo luminal expresan receptores hormonales con perfiles de expresión reminiscentes al componente epitelial luminal de la mama. Estos patrones incluyen la expresión de citoqueratinas luminales 8/18, receptores a estrógenos (**ER**), receptores a progesterona **PR** y genes asociados con la

activación de **ER** como **LIV1** y **CCND**. Existen al menos dos subtipos dentro de tumores de tipo luminal: luminal A y luminal B (Dai *et al.*, 2015).

#### **1.3.1.1 Luminal A**

Es el subtipo más común y representa aproximadamente el 23.7% de todos los tumores de mama (Dai *et al.*, 2015). Estos tumores se caracterizan por presentar bajo grado de pleomorfismo nuclear, actividad mitótica baja e incluyen tipos histológicos especiales (es decir, cribriforme tubular, invasivo, mucinoso y lobular) y tienen un buen pronóstico. Se caracteriza también por presentar altos niveles de **ER** y **PR**, y niveles bajos de genes relacionados con la proliferación celular, de igual forma se presenta la expresión de las citoqueratinas epiteliales lumbales (**CK**) 8 y 18, y genes asociados con la función del **ER** como **LIV1**. En general se define como **ER (+), PR (+), HER2 (-)** (Yersal & Barutca, 2014).

Los pacientes con cáncer de mama luminal A tienen una tasa de reincidencia significativamente menor en comparación con otros subtipos, los tratamientos dirigidos hacia este subtipo se basan principalmente en la terapia hormonal (Yersal & Barutca, 2014).

#### **1.3.1.2 Luminal B.**

Comprenden aproximadamente el 38.8% de los tumores de mama (Dai *et al.*, 2015), y tienen un fenotipo más agresivo que el luminal A, ya que presentan mayores niveles de expresión de genes involucrados en la proliferación celular como el marcador de proliferación Ki67 (MKI67) (Ades *et al.*, 2014), lo cual aumenta el índice proliferativo y por lo tanto tiene un pronóstico menos favorable en comparación con el luminal A (Ades *et al.*, 2014). La principal diferencia que presenta respecto al luminal A es un aumento de la expresión de genes involucrados en la proliferación celular. En general se define como **ER (+), PR (+) y HER2 (+)** (Yersal & Barutca, 2014).

Diversos estudios han documentado que este subtipo es insensible a la terapia hormonal, sin embargo responde mejor a quimioterapia neoadjuvante (Yersal & Barutca, 2014).

### 1.3.2 ErbB2 positivo

El cáncer ErbB2 positivo representa aproximadamente el 11.2% de los tumores de mama (Dai *et al.*, 2015), estos tumores son morfológicamente agresivos y se caracterizan por una alta expresión del gen **ErbB2**. Morfológicamente estos tumores son altamente proliferativos y más del 40% tiene mutaciones en **p53** (Yersal & Barutca, 2014).

Diversos estudios han demostrado que el 11.2% de los tumores de mama invasivos tienen la sobreexpresión de ErbB2 (Blackwell *et al.*, 2010).

En ausencia de tratamiento, los tumores ErbB2 positivos tienen un mal pronóstico, tienen mayor sensibilidad a ciertos agentes citotóxicos como la doxorubicina debido a la co-amplificación del gen que codifica para la topoisomerasa-2, que está cerca del locus de ErbB2 en el cromosoma 17 y es el blanco terapéutico de este fármaco (Yersal & Barutca, 2014). La terapia con el anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab ha sido un gran avance clínico para el tratamiento contra este tipo de tumores, sin embargo en el caso de los tumores metastásicos, estos no responden al tratamiento (Blackwell *et al.*, 2010).

Este subtipo se caracteriza por la sobreexpresión del receptor HER2 y la pérdida de la expresión del receptor a estrógenos (ER) y progesterona (PR), es decir, **ER (-) PR (-), HER2 (++)** (Révillion *et al.*, 1998).

### 1.3.3 Basal

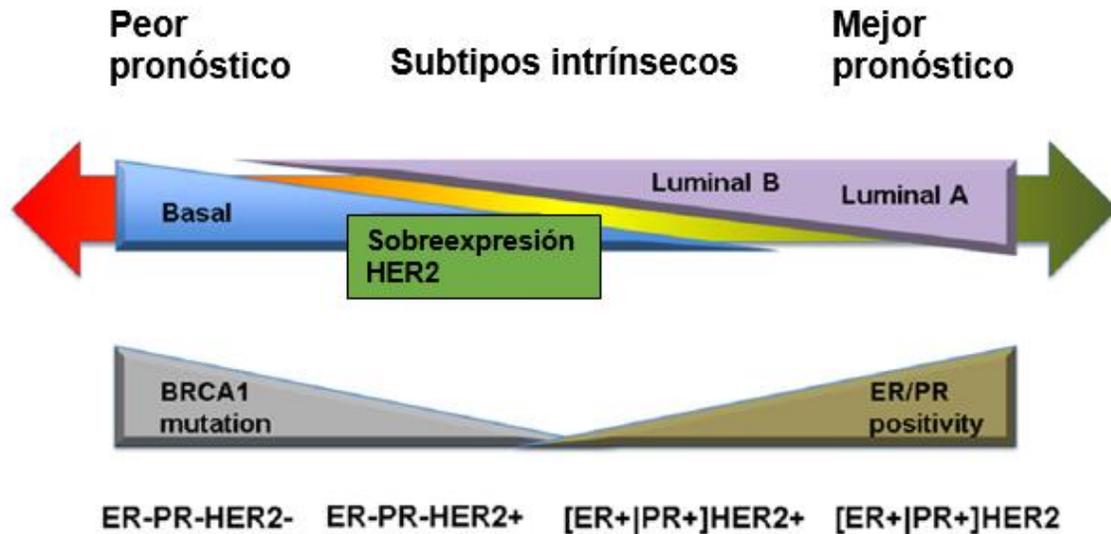
Este subtipo representa aproximadamente el 12.3% del total de tumores de mama (Dai *et al.*, 2015), se caracteriza por ser negativo a los tres receptores **ER (-), PR (-), HER2 (-)**; sin embargo presenta altos niveles de marcadores basales mioepiteliales como: **CK5, CK14, CK17 y laminina, así como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)** (Cheang *et al.*, 2008). Se consideran tumores altamente invasivos ya que **la mayoría presenta infiltración intraductal con patrón de crecimiento sólido**. En general se describen como **ER (-), PR (-) y HER2 (-), EGFR (+)**, con frecuencia presentan mutaciones en el gen que codifica a la proteína de reparación de daño al DNA por recombinación homóloga BRCA1. En estos tumores el EGFR puede ser un blanco terapéutico potencial y se ha propuesto que también podrían desarrollarse terapias dirigidas hacia genes implicados en la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis (Yersal & Barutca, 2014).

### 1.3.4 Triple negativo

Estos tumores representan aproximadamente el 15% del total de los tumores de mama (Lehmann, *et al.*, 2011), se definieron por criterios de exclusión ya que resultan negativos ante todos los marcadores **ER (-), PR (-), HER2 (-) y CK (-)**, lo cual los hace de interés particular porque actualmente carecen de cualquier tipo de terapia sistémica dirigida comparada con los subtipos anteriores (Shah *et al.*, 2012).

Debido a la ausencia de directrices específicas de tratamiento para este subtipo se administran tratamientos como quimioterapia sistémica tanto en etapas tempranas como avanzadas sin embargo este tratamiento está asociado con un alto índice de reincidencia, por lo cual es de suma importancia encontrar nuevos blancos moleculares que den mejores resultados (Bianchini *et al.*, 2016).

Histológicamente este subtipo de cáncer está poco diferenciado y la mayoría caen en el subtipo basal de cáncer de mama, sin embargo presentan diferentes perfiles de expresión genética por lo cual se clasifican en distintos subgrupos (Cleator & Coombes, 2007).



**Figura 2. Subtipos moleculares de cáncer de mama.** Se presentan las características de cada subtipo molecular de cáncer de mama así como su pronóstico. El subtipo basal se caracteriza por ser **ER (-), PR (-), HER2 (-)**, frecuentemente con mutaciones en el gen supresor de tumores (BRCA1 mutation) y tiene un mal pronóstico. El subtipo ErbB2 positivo se caracteriza por ser **ER (-), PR (-) y HER2 (++)** y tiene un mal pronóstico. El subtipo luminal B se caracteriza por ser **ER (+), PR (+) HER2 (+)** y tiene un mal pronóstico por sobreexpresar genes involucrados en proliferación celular, y finalmente el luminal A es **ER (+), PR (+) y HER2 (-)** y tiene un buen pronóstico por la baja expresión de genes relacionados a proliferación celular, esta característica lo diferencia del subtipo luminal B. Recuperado de (Dai *et al.*, 2015).

## **1.4 Vías de señalización que regulan la progresión en el cáncer de mama.**

Existe una gran variedad de proteínas y hormonas involucradas en la regulación y progresión del cáncer. El microambiente tumoral se reconoce ahora como un factor significativo en la respuesta al tratamiento del cáncer (Kamdje *et al.*, 2014). Investigaciones recientes han proporcionado valiosa información sobre la biología tumoral, basándose en las principales vías de señalización involucradas en la progresión del cáncer de mama, entre las cuales se encuentran la vía de PI3K/Akt/mTOR y la vía de las MAPK las cuales regulan procesos como proliferación y migración, progresión del ciclo celular y supervivencia (Eroles *et al.*, 2012).

### **1.4.1 Vía de PI3K/Akt/mTOR**

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt/mTOR es crucial para el crecimiento y supervivencia celular, esta vía está ampliamente interconectada con una gran variedad de rutas de señalización y tiene un papel crucial en el desarrollo de cáncer (Porta *et al.*, 2014).

Una vez que es fosforilada por Akt, mTOR se encarga de integrar las señales iniciadas por la ingesta de nutrientes, factores de crecimiento y otros estímulos celulares, para regular la síntesis de proteínas (Shaw & Cantley., 2006). A través de sus efectores río abajo, 4EBP1 y p70S6 cinasa (S6K), participa en la traducción de proteínas necesarias para el crecimiento, metabolismo y progresión del ciclo celular (Porta *et al.*, 2014).

Diversas mutaciones somáticas afectan esta vías en distintos tumores sólidos entre los cuales se encuentran el de mama y colón (Shaw & Cantley., 2006). La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR resulta en una perturbación profunda de

control del crecimiento y supervivencia celular, lo que conduce a la competencia metastásica, angiogénesis y resistencia a terapias dirigidas (Porta *et al.*, 2014).

#### **1.4.2 Vía de las MAPK**

La vía de señalización de RAS/RAF/MEK/ERK, mejor conocida como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), transmite y amplifica señales implicadas en procesos celulares importantes como proliferación y muerte celular (Santen *et al.*, 2002).

La vía de MAPK es un punto de señalización importante en el que convergen numerosos estímulos incluyendo el estrés metabólico interno y el daño a DNA, interacciones célula-matriz extracelular y la interacción con otras células (Yang *et al.*, 2013). Diversas mutaciones pueden alterar esta vía, y pueden ocurrir en los genes que codifican a receptores de membrana, tales como el EGFR, en moléculas señalizadoras como RAS, y en cinasas río abajo pertenecientes a la vía MAPK/ERK como RAF, todas estas mutaciones se han identificado en distintos tumores humanos entre ellos el de mama (Burotto *et al.*, 2014).

#### **1.4.3 Receptor HER2**

La familia de los receptores HER en humanos está constituida por cuatro distintos receptores con actividad de tirosina cinasa (HER1 /ErbB1, también denominado el EGFR, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, y HER4/ErbB4). Estas proteínas son receptores de membrana las cuales pueden ser activadas por la unión de un ligando a receptores específicos (como, EGF, TGF- $\alpha$ , entre otros) o por dimerización del receptor (Graus *et al.*, 1997).

Todos ellos tienen un papel importante en la progresión de diversos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, próstata y de colon (Arias-Romero *et al.*, 2010).

La sobreexpresión, amplificación o mutación del gen *HER2* se produce en aproximadamente 25% de los tumores de mama humanos, y está asociada con la progresión de la enfermedad, metástasis y en general un mal pronóstico; sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares por los cuales HER2 aumenta el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas aún no son entendidos completamente (Arias-Romero *et al*, 2010).

### **1.5 Vías de señalización reguladas por PAKs**

Diversos grupos de investigación han reportado que la dimerización de HER2 y de otros receptores a factores de crecimiento promueve la estimulación mediada por RAS de las vías de RAF/MEK/ERK y de PI3K/AKT/mTOR que conducen al crecimiento, la migración, y la supervivencia de células cancerosas. También se ha sugerido que la señalización a través de estas vías puede ser regulada por algún miembro de la familia de proteínas cinasas activadas por p21 (PAKs), las cuales son efectores de las GTPasas pequeñas de la familia Rho (Beeser *et al*, 2005).

Recientemente se ha reportado que las cinasas PAK participan en diversas vías de señalización oncogénicas. La sobreexpresión o la activación resultado de mutaciones de las isoformas PAK se observa con frecuencia en diversos tumores y datos recientes sugieren que la actividad excesiva de PAK impulsa muchos procesos celulares implicados en las capacidades adquiridas del cáncer (Radu *et al*, 2014).

## 1.6 PROTEÍNAS PAK

Cdc42 y Rac son proteínas con actividad GTPasa que presentan dos estados conformacionales: unión a GDP en su estado inactivo y la unión a GTP en su estado activo (Arias & Chernoff, 2008). La forma activa de Cdc42 y Rac induce cambios conformacionales lo cual favorece la interacción con moléculas efectoras que transmiten señales (Arias & Chernoff, 2008). Entre los efectores mejor caracterizados de Cdc42 y Rac se encuentran las proteínas cinasas de la familia PAK, las cuales son un grupo altamente conservado de cinasas de serina/treonina que sirven como mediadores de la función de Cdc42 y Rac (Zhao & Manser, 2012). Estas proteínas se han clasificado en dos grupos de acuerdo a la homología en sus secuencias y a sus propiedades bioquímicas, PAK1, PAK2 y PAK3 han sido asignados al grupo I, mientras que PAK4, PAK5 y PAK6 pertenecen al grupo II (Zhao & Manser, 2012). Todas las cinasas PAK poseen un dominio C-terminal conservado con actividad serina/ treonina cinasa y un dominio regulador N-terminal. La regulación de las PAKs de grupo I (PAK1-3) es estructuralmente distinto de las PAKs del grupo II (PAK4-6), consistente con los diferentes mecanismos que regulan la actividad de estas proteínas (Radu *et al.*, 2014).

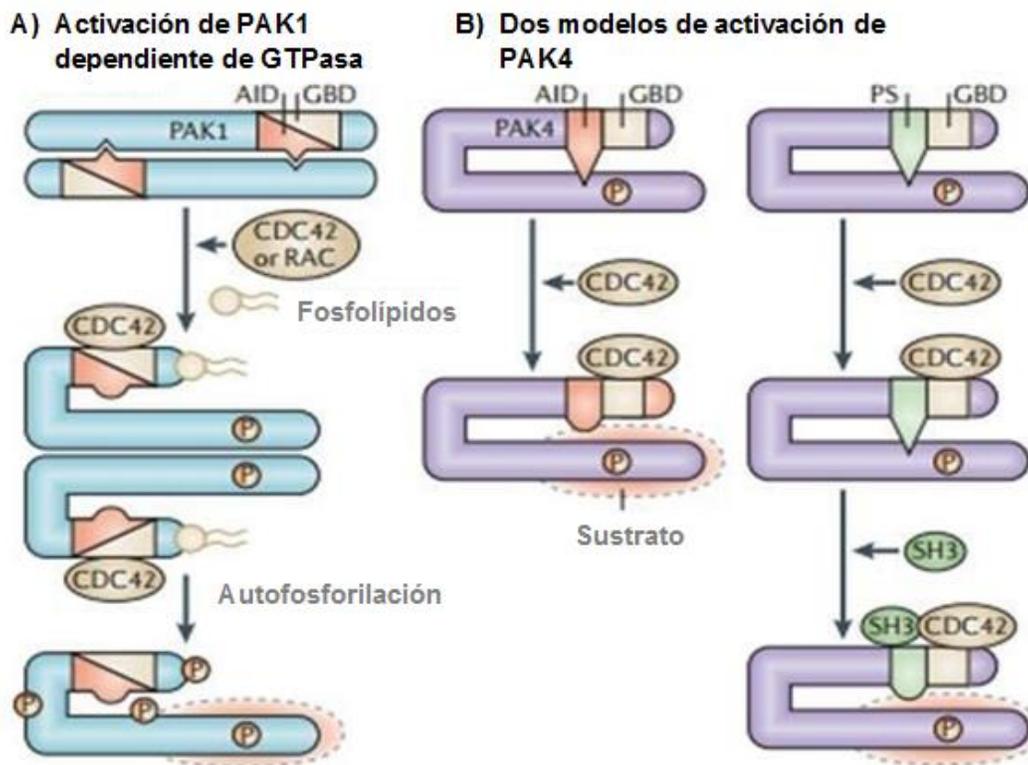
### 1.6.1 Activación de PAKs del grupo I

Se ha reportado que las PAKs de este grupo se regulan a través de auto inhibición por un mecanismo en trans, donde el dominio de unión a GTPasa (GBD) se sobrelapa con un dominio de autoinhibición (AID) (Jaffer & Chernoff, 2002). PAK se pliega en un homodímero inactivo, en el que el AID de un monómero, se une al dominio de cinasa de otro monómero, impidiendo así que fosforile a sus sustratos.

La unión de las formas activas de Cdc42 o Rac al GBD, conduce a la disociación del AID, la reorganización del dímero, su posterior autofosforilación y finalmente la disociación de ambos monómeros (Figura 3 a) (Jaffer & Chernoff, 2002). Posteriormente se da una autofosforilación en múltiples sitios lo cual estabiliza este estado catalíticamente activo (Radu *et al.*, 2014).

### **1.6.2 Activación de PAKs del grupo II**

El mecanismo de activación de este grupo de cinasas es menos claro que el anterior, a diferencia de las PAKs del grupo I, estas se encuentran constitutivamente fosforiladas, por lo tanto la transición a la forma activa depende probablemente de cambios conformacionales (Radu *et al.*, 2014). Se pensaba que este grupo de PAKs carecía de un dominio AID y que las interacciones con Cdc42 servían principalmente para determinar la ubicación subcelular de la proteína (Zhao & Manser, 2012); sin embargo, un estudio reciente propone la presencia de una AID en la región N-terminal de PAK4 lo cual inactiva el dominio cinasa en cis, hasta que se da la unión de GTP-Cdc42. Una alternativa a este modelo propone que PAK4 es inhibido por la interacción del dominio cinasa a un pseudosustrato (PS) dentro del dominio regulador de PAK4. En este modelo, la unión de las proteínas que contienen el dominio SH3 al PS libera el catalizador, promoviendo así la actividad cinasa. Se piensa que PAK5 y PAK6 también sigue este modelo, pero esto no ha sido verificado experimentalmente (Figura 3 b) (Radu *et al.*, 2014).



**Figura 3. Activación de las PAK del grupo I y las PAK del grupo II.** Se muestran los mecanismos de activación de los dos grupos de proteínas PAK, el dominio regulatorio de las PAKs del grupo I es estructuralmente distinto al de las PAKs del grupo II. Las PAKs del grupo I se regulan por un mecanismo de auto inhibición, en el cual el dominio de unión a GTPasa (GBD) se une al dominio de auto inhibición (AID) formando un homodímero inactivo, donde el AID se une al dominio de cinasa de una PAK adyacente, la unión de una GTPasa como Rac o Cdc42 al GBD permite la disociación del dominio AID del dominio de cinasa, permitiendo la autofosforilación. En el caso del grupo II el dominio de cinasa se encuentra constitutivamente fosforilado por lo cual su activación en este caso depende de cambios conformacionales; existen dos modelos para explicar la activación de las PAKs de este grupo el primero propone que el AID inactiva al dominio cinasa hasta la unión de GTP-Cdc42 y una alternativa propone que la inhibición se presenta por la interacción del dominio cinasa con una secuencia pseudosustrato similar a AID (PS), en

este caso la unión de proteínas que contienen un dominio SH3 se unen a PS promoviendo la actividad cinasa.

### **1.6.3 PROTEÍNAS PAK Y CÁNCER**

La actividad de las proteínas PAK se ha relacionado con las vías de señalización de proliferación, procesos morfogénicos que controlan la polaridad celular y la organización del citoesqueleto de actina en células eucarióticas superiores (Arias & Chernoff, 2008).

La proteína PAK1, se encuentra sobreexpresado en aproximadamente el 30% de los tumores de mama debido a la amplificación de su locus genético ubicado en el cromosoma 11q13 y esta amplificación se asocia con un mal pronóstico (Arias & Chernoff, 2008). En células epiteliales mamarias humanas, se ha reportado que PAK1 ejerce un poderoso efecto sobre la adquisición de la independencia de anclaje (Radu *et al.*, 2014).

Experimentos empleando microarreglos de fosfoanticuerpos, han mostrado que en células de cáncer de mama ErbB2 positivas y deficientes de PAK1, hay una disminución en la expresión y/o fosforilación de proteínas asociadas a la oncogénesis, como por ejemplo  $\beta$ -catenina, RAF, ERK, FAK, JAK2, y c-ABL (Arias-Romero *et al.* 2013). De entre estas proteínas, la cinasa c-ABL es de particular interés para este proyecto, ya que en su forma activa promueve el desarrollo de leucemia (Greuber *et al.*, 2013) y de igual forma se le ha relacionado con el potencial metastásico de tumores de mama (Greuber *et al.*, 2013 & Srinivasan & Plattner., 2006). Hasta la fecha, existen un par de estudios que reportan la interacción de otro miembro de la familia PAK, PAK2, con c-ABL (Roig *et al.*, 2000 & Jung *et al.*, 2008), pero el papel de esta asociación no es claro, por lo que en este trabajo estudiaremos si c-ABL es un sustrato directo de PAK1, para en un futuro, determinar cuál es el efecto biológico de las(s) fosforilación(es) mediadas por PAK1 en la actividad de c-ABL.

## 1.7 PROTEÍNA C-ABL

La proteína c-ABL es una tirosina cinasa no receptora que está localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma y está implicada en la regulación de procesos celulares durante el desarrollo y la homeostasis normal como son el crecimiento celular, supervivencia y morfogénesis. Las funciones de c-ABL se ven alteradas durante procesos de inflamación, cáncer y otras patologías (Morrison *et al.*, 2017). Puede ser activada por estímulos múltiples que conducen a la reorganización del citoesqueleto necesaria para la morfogénesis celular, motilidad, adhesión y polaridad y dependiendo del contexto celular estas proteínas regulan la supervivencia y proliferación celular (Khatri & Pendergast, 2016).

Las proteínas c-ABL muestran una organización similar a la de los miembros de la familia Src que se caracteriza por un dominio N- terminal único seguido de un dominio SH3, un dominio SH2 y un dominio catalítico con actividad tirosina cinasa (Khatri & Pendergast, 2016). Sin embargo la región C- terminal corta presente en Src es sustituida en este caso por una secuencia grande y única codificada por el último exón lo cual las hace tener una función diferente (Sirvent & Roche, 2008 ). Esta región contiene un dominio de unión a F-actina (filamenosa) y G-actina (globular) una secuencia de exportación nuclear NESs y secuencias ricas en prolina que permiten la interacción con otras proteínas que contienen el dominio SH3, además contiene secuencias de unión a ADN importantes para funciones nucleares (Sirvent & Roche, 2008).



**Figura 4. Estructura molecular de la proteína c-ABL.** Se muestra la estructura de la proteína c-ABL la cual cuenta con un dominio N-terminal en el cual se encuentra una región CAP conservada, seguida del dominio SH3 (verde) y SH2 (amarillo) los cuales participan en la regulación de la proteína, posteriormente se encuentra el dominio cinasa (vino) en el cual se da la activación de la proteína, seguido de una secuencia rica en prolinas que permite la interacción con otras proteínas, de igual forma se encuentra una secuencia de localización nuclear (NLS) y un dominio de exportación nuclear (NES).

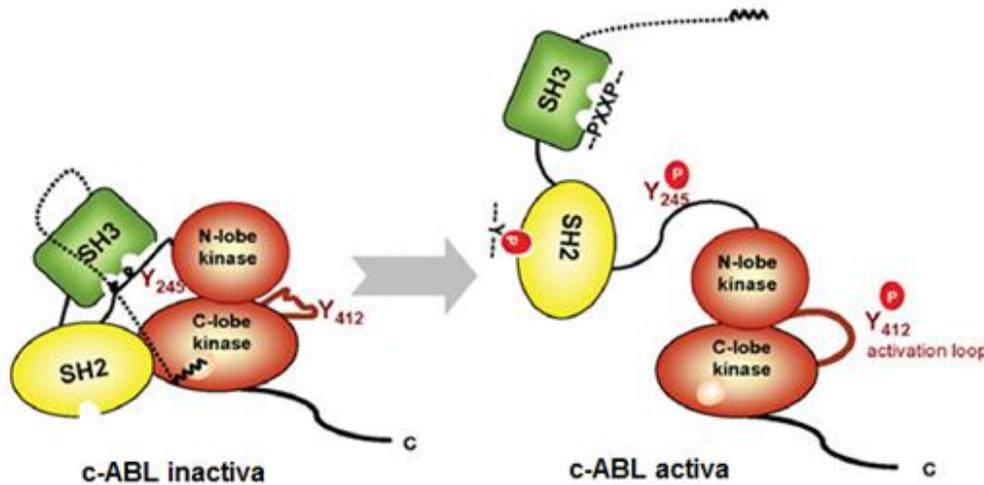
Las formas oncogénicas de c-ABL se han identificado en algunas formas de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) y leucemia mieloide aguda (LMA), en este tipo de tumores la hiperactividad de ABL se da por fusiones tales como BCR-ABL, NUP214-ABL, EML1-ABL, ETV6-ABL (Hagemeijer & Graux., 2010), sin embargo diversos estudios reportan la hiperactividad de ABL en tumores sólidos como el de mama, no obstante, en estos tumores la hiperactividad no está relacionada con la fusión de ABL a ningún otro gen (Khatri & Pendergast, 2016).

Aunque la función nuclear c-ABL ha sido ampliamente estudiada los datos recientes también indican que podría jugar un papel importante en la señalización citoplasmática implicada en el desarrollo de tumores sólidos (Sirvent & Roche, 2008).

### **1.7.1 Regulación de c-ABL**

La activación de c-ABL está regulada por interacciones intramoleculares que mantienen el dominio cinasa en una conformación inactiva, lo cual ha sido determinado por análisis bioquímicos y estructurales. La conformación inactiva de c-ABL implica la interacción entre el dominio SH3 y la secuencia rica en prolina presente en el dominio SH2 con el dominio de cinasa. Todas estas interacciones participan en el proceso de autoinhibición de c-ABL y la desestabilización de estas

interacciones por mutaciones conduce a la actividad constitutiva de esta cinasa (Khatri & Pendergast, 2016).



**Figura 5. Activación e inactivación de c-ABL por cambios conformacionales.**

Adicionalmente c-ABL también es regulada por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, un análisis fosfoproteómico identificó al menos 12 residuos de tirosina que pueden ser fosforilados por diferentes cinasas, todos estos agrupados en el extremo N-terminal (Hantschel & Oliver, 2012). La función de Tyr245 y Tyr412 ha sido cuidadosamente analizada y la mutagénesis en estos sitios ha confirmado que son necesarios para la activación de c-ABL, no obstante la naturaleza de las cinasas involucradas no se ha establecido por completo. Por otra parte, c-ABL también se fosforila en residuos de serina y treonina los cuales participan en la regulación catalítica, tal es el caso de los sitios fosforilados por la cinasa PAK2 la cual se ha demostrado que interactúa con c-ABL y fosforila los residuos de serina en las posiciones 637 y 638 (Sirvent & Roche, 2008). En general, estos datos sugieren que la fosforilación es un mecanismo importante y compleja de la regulación de c-ABL (Sirvent & Roche, 2008). Sin embargo es

importante determinar si fosforilaciones en otros residuos afectan la actividad y/o localización celular de c-ABL.

### **1.7.2 PROTEÍNA c-ABL Y CÁNCER**

Las cinasas c-ABL citoplásmicas están implicadas en el desarrollo de cáncer en humanos, y su actividad se ve frecuentemente afectada en leucemias, lo que conducen a la transformación celular y a la progresión del cáncer (Krause & Van Etten, 2005). Estudios recientes indican que la actividad de c-ABL es elevada en tumores sólidos como el de mama, lo cual favorece el crecimiento del tumor (Sirvent & Roche, 2008).

Diversos estudios han reportado la fusión de c-ABL con un número creciente de genes en algunos tipos de leucemias. Además de BCR han sido identificados otros genes de fusión a c-ABL incluyendo NUP214-ABL, EML1-ABL, ETV6-ABL (Hantschel & Oliver, 2012). En general las distintas fusiones se unen al dominio N-terminal de c-ABL promoviendo las actividades de transformación mediante la disrupción inhibitoria de interacciones intramoleculares, proporcionando secuencias que facilitan la oligomerización potenciando la activación y/o reclutando cinasas quiméricas a sitios subcelulares y complejos proteicos distintos (Greuber *et al.*, 2013).

Diversos estudios han reportado que los mecanismos que regulan la activación de c-ABL en tumores sólidos difieren de la observada en leucemias en las cuales sucede la fusión de c-ABL con algunos genes como es el caso de BCR-ABL. En tumores sólidos la activación de c-ABL se ha relacionado con la estimulación de receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK) (Srinivasan & Plattner, 2006).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el cáncer de mama es un grave problema de salud pública por ser el cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo y la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en mujeres jóvenes. En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte entre las mujeres de 30 a 45 años de edad y afecta a mujeres de todos los niveles socioeconómicos (Knaul *et al.*, 2009).

Distintos grupos de investigación han reportado que en aproximadamente el 25-30% de las muestras de cáncer de mama hay una amplificación de la región cromosómica 11q13 que es donde se encuentra localizado el gen de *PAK1* (Ormandy *et al.*, 2003 & Holm *et al.*, 2006), la proteína codificada por este gen es un regulador de distintas vías de transducción involucradas en la reorganización del citoesqueleto, migración y proliferación celular, etc., por esta razón; el estudio de los mecanismos moleculares a través de los cuales esta enzima controla dichos procesos es de particular importancia para comprender mejor la fisiopatología del cáncer de mama. Recientemente, se ha reportado que *PAK1* podría estar involucrada en la progresión del cáncer de mama y en la regulación de la respuesta a hormonas a través de la interacción y fosforilación del receptor a estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) en el residuo de serina 305 (Tharakan *et al.*, 2008), se ha propuesto que la inhibición de *PAK1* podría ser benéfica en las pacientes con tumores de mama positivos para ErbB2/Her2 y que son insensibles al tratamiento con tamoxifen (Rayala & Kumar, 2007). Adicionalmente, los resultados obtenidos en los experimentos de fosfoproteómica previamente descritos, han permitido identificar distintas moléculas señalizadoras cuya actividad se ve afectada por la inhibición de *PAK1* (Arias-Romero *et al.*, 2013). Un ejemplo es, la cinasa c-ABL, la cual en su forma activa promueve el desarrollo de leucemia, y recientemente se le ha relacionado con el potencial metastásico de tumores de mama (Greuber *et al.*, 2013 & Srinivasan & Plattner., 2006). Hasta la fecha, existen un par de estudios que reportan la interacción de otro miembro de la familia PAK, *PAK2*, con c-ABL, pero el papel de esta asociación no es claro (Roig *et al.*, 2000 & Jung *et al.*, 2008).

Esta serie de propiedades, hacen a PAK1 un interesante blanco terapéutico, ya que en teoría su inhibición puede resultar benéfica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, especialmente aquellos tumores en los que el gen PAK1 se encuentra amplificado o sobreexpresado. En los últimos años, el cáncer ha registrado una mayor incidencia en nuestro país, por lo que es necesario realizar estudios que potencialmente puedan ser trasladados a la clínica. En este caso, el estudio detallado de los mecanismos moleculares por los cuales PAK1 promueve la transformación celular, así como los efectos de su inhibición en modelos celulares y animales, potencialmente podría ayudar a mejorar el diseño de terapias combinadas para el tratamiento del cáncer de una manera más efectiva.

### **3. HIPOTESIS**

La onco-proteína c-ABL puede ser fosforilada directamente por la cinasa PAK1 y esta fosforilación puede tener implicaciones biológicas en la transformación de células epiteliales de glándula mamaria.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la proteína tirosina cinasa c-ABL es un sustrato directo de PAK1 *in vitro* y si ambas proteínas interactúan en un contexto celular.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

**5.1** Determinar por análisis bioinformáticos si c-ABL tiene secuencias consenso de fosforilación mediadas por PAK1.

**5.2** Evaluar por ensayos de cinasa *in vitro* si c-ABL es un sustrato directo de PAK1.

**5.3** Determinar si las oncoproteínas PAK1 y c-ABL interactúan físicamente en líneas celulares de cáncer de mama.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Ensayos de actividad de cinasa *in vitro*

El ensayo de cinasa se realizó incubando PAK1 con cada uno de sus potenciales sustratos (10 µg de GST-C-ABL-S16, GST-C-ABL-S638, GST-C-ABL-S878, GST-C-ABL-S955, 10 µg de GST como control negativo en buffer cinasa 1X (MgCl 10 mM, Hepes 40 mM, pH 7.4) suplementado con ATP 5 µM durante 30 min a 30° C en un volumen de reacción de 25 µL. Como controles negativos, se incubó a PAK1 con 10 µg de GST o a PAK1 en ausencia de sustrato. Las reacciones se detuvieron hirviendo las muestras en buffer de muestra para proteínas 1X, posteriormente las proteínas fueron separadas en un gel de SDS-PAGE y finalmente la incorporación de ATP en los potenciales sustratos se determinó mediante la técnica de Western blot empleando anticuerpos anti-fosfo-serina (1:1000) (Zymed®).

### 6.2 Cultivo celular.

La línea celular de epitelio de glándula mamaria no transformado MCF-10A se cultivó en medio DMEM/F12 (BIOWEST®), las líneas celulares cancerosas MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM (BIOWEST®) y la línea celular BT474 se cultivó en medio McCoy (GIBCO ®). Todos los medios fueron suplementados con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibiótico/antimicótico al 1%, los cultivos se incubaron en una atmósfera húmeda compuesta por 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a una temperatura constante de 37° C. El medio se cambió dos veces por semana monitoreando mediante microscopía la confluencia del cultivo.

### **6.3 Obtención de PAK1 recombinante**

Para generar la proteína recombinante PAK1 se utilizó el vector pCMV-6M-PAK1-L107F, proporcionado por el Dr. Jonathan Chernoff (plásmido de addgene # 12209), este plásmido contiene un fragmento de DNA que codifica para una bandera de Myc (en la región N-terminal) fusionado a la secuencia que codifica para la proteína PAK1 constitutivamente activa.

### **6.4 Transfección de pCMV-6M-PAK1-L107F**

Para la transfección de DNA en células HEK293T, se usó el método de lipofección bajo el siguiente protocolo: se sembraron  $5 \times 10^6$  células en una botella de cultivo y se transfectaron con 50 ul de reactivo Lipofectamine® LTX (Invitrogen) MEM® (GIBCO) los complejos de DNA - lípidos catiónicos se prepararon diluyendo 10 ug de DNA (plásmido pCMV-6M-PAK1-L107F) en 720 ul de Opti-MEM® y añadiendo 10 ul de Reactivo Plus™. Posteriormente se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se añadieron 10 ul de lipofectamina diluida en 740 ul de Opti-MEM®, se mezclaron y se volvieron a incubar 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron una vez con 5 ml de PBS 1X estéril y se les añadieron 10 ml de Opti-MEM® y la mezcla de DNA-lipofectamina se añadió al cultivo por goteo. Finalmente las células se incubaron a 37° C durante 3 hrs, se les cambió el Opti-MEM® por medio con suero y 48 horas post transfección se lavaron y lisaron en solución salina tamponada con fosfato [(PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, PH 7.4 (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1%), desoxicolato de sodio (0.5%), SDS (0.1%), EDTA (5 mM), inhibidor de proteasas (COMPLETE, Roche)]. La suspensión de células se lisó a continuación mediante agitación en vórtex y el homogeneizado se centrifugó a 13500 rpm en una microcentrífuga.

## **6.5 Cuantificación de proteínas**

La concentración total de proteínas fue determinada a partir de los lisados celulares. El ensayo de cuantificación de proteínas fue realizado con el método de Lowry, que se basa en la reacción de  $\text{Cu}^+$  producido por la oxidación de enlaces peptídicos, usando el kit DC Protein Assay (BIORAD®), de acuerdo con las instrucciones de fábrica. Se generó una curva estándar usando albúmina de suero bovino en un rango de concentraciones de 0 a 1 mg/mL. Las lecturas de absorbancia se tomaron a 750 nm y todas las muestras fueron cuantificadas por triplicado.

## **6.6 Inmunoprecipitación de PAK1 a partir de lisados celulares**

Para la inmunoprecipitación de PAK1, se emplearon 100  $\mu\text{g}$  de proteína total en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  con un buffer de inmunoprecipitación (Tris HCL pH 7.4 50 Mm, Nonidet P-40 1%, Deoxicolato de sodio 0.25%, NaCl 120 Mm, EDTA 1Mm,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1Mm, Complete 2%, Perlas asociadas a proteínas G) posteriormente el sobrenadante fue preclareado con 30  $\mu\text{L}$  de perlas de agarosa unidas a proteína A y se incubó a 4°C durante 2 horas, se añadió 1  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti-myc (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Cellsignal ®). El sobrenadante fue removido y las perlas fueron lavadas 3 veces con buffer de inmunoprecipitación y resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de buffer de inmunoprecipitación.

## **6.7 SDS-PAGE**

Para determinar que la inmunoprecipitación de PAK1 haya sido correcta se migraron 10  $\mu\text{L}$  del material de inmunoprecipitación en geles de SDS-poliacrilamida. El gel de resolución se preparó con las siguientes concentraciones finales: Acrilamida 10%, Bis-acrilamida 1%, Tris base 375 mM pH = 8.8 y SDS al 0.1%. Para conseguir la polimerización del gel se añadió 0.05% de persulfato de amonio y 0.003% de TEMED. En cuanto al gel concentrador, las concentraciones

finales fueron: Acrilamida 4%, Bis-acrilamida 0.1%, Tris base 125 mM pH = 6.8 y SDS 0.1%, 0.05% persulfato amónico y 0.005% TEMED. Después de que polimerizó el gel se añadió buffer Laemmli 6X (Tris-HCl 375 mM pH = 6.8, SDS al 9%, glicerol al 50%, beta-mercaptoetanol al 9%, bromofenol al 0.03% Azul) al material inmunoprecipitado a una concentración final de 1X, se hirvió a 96° C durante 5 min y se cargó directamente sobre el gel de SDS-PAGE. La electroforesis se inició usando buffer de corrida (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS al 0.1%) a un voltaje constante de 120 V. Una vez finalizada la migración, se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se realizó transferencia Western a una membrana de PVDF (Millipore).

### **6.8 Western blot**

Las proteínas separadas electroforéticamente en un gel de SDS-PAGE se transfieren a una membrana de PVDF. Para realizar la transferencia brevemente, se preparó un sándwich de transferencia de la siguiente manera: primero una esponja previamente humedecida en buffer de transferencia, luego dos papeles Whatman también humedecidos en el mismo buffer, luego el gel, luego se colocó la membrana seguida de dos papeles Whatman y una esponja. Al ensamblar este sándwich se cuidó de no dejar burbujas que pudieran interferir con la transferencia de las proteínas a la membrana. La transferencia de proteínas se realizó desde el polo negativo (gel) hasta el polo positivo (membrana de PVDF). Este sandwich se introdujo en la cámara de transferencia que se llenó con buffer de transferencia hasta el límite indicado. Para evitar que el buffer se sobrecaliente, la transferencia se realizó en un baño de hielo durante 60 min a 400 mA. Tras la finalización de la transferencia y para verificar la transferencia de las proteínas, la membrana se tiñó con solución de rojo de Ponceau al 0.5% en ácido acético al 2% durante 5 min a temperatura ambiente y se lavó con ddH<sub>2</sub>O. Una vez corroborada la transferencia de las proteínas, las membranas se bloquearon en leche sin grasa al 5% en TBS-

Tween 0.1% (Tris base 50 mM, pH = 7.5, NaCl 150 mM) durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario [Anti-myc 1: 30000 (Abcam®), anti-PAK1 1:1000) (Cellsignal®)] en solución de bloqueo durante la noche a 4° C. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces cada 15 min con TBS-Tween 0.1%. Después del último lavado, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo (1:10000) conjugado con peroxidasa de rábano durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados adicionales de 15 minutos con TBS-Tween 0.1%. Las membranas se sumergieron en 1 ml de solución Clarity Western ECL Substrato (BIORAD®). Después de este tiempo, las membranas fueron expuestas a una placa radiográfica "HyBlot ES® Autoradiography Film (Denville scientific Inc.)".

### **6.9 Análisis *in silico* de la fosforilación de C-ABL mediada por PAK1.**

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de c-ABL en la base de datos de NCBI. Usando el software Group-Based Prediction System (GPS) 3.0 se determinaron los posibles sitios consenso de fosforilación de PAK1. Se tomaron como candidatos los sitios con un score mayor a 10.

### **6.10 Obtención de RNA.**

La obtención del mRNA de la proteína c-ABL se realizó mediante la extracción de RNA total de la línea celular MDA-MB-231 que expresa altos niveles de c-ABL. La extracción se hizo siguiendo el protocolo de TRIzol™ Reagent (Invitrogen) de la siguiente manera: una vez que la caja de cultivo de células MDA-MB-231 se encontró al 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 1X dos veces a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 1000 uL de TRIzol™ Reagent directamente en la caja de cultivo y se incubó por 5 minutos, una vez transcurrido el tiempo se rasparon las células con un gendarme y se recuperó el contenido en un tubo eppendorf 1.5 mL estéril.

Posteriormente se le agregaron 200 uL de cloroformo grado biología molecular, se agitó vigorosamente y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de células con trizol y cloroformo se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4° C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf y se le añadieron 600 uL de isopropanol. El RNA se precipitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y la mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4° C. Finalmente el sedimento donde se quedó el RNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente, y se resuspendió en 30 uL agua libre de RNAsas.

### **6.11 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).**

Para la obtención del cDNA del gen que codifica a la proteína c-ABL a partir del mRNA obtenido previamente se realizó un ensayo de RT-PCR. Para la reacción de RT-PCR primero se eliminó el DNA de la muestra de acuerdo al protocolo descrito para el kit “RNA-free”. Brevemente, 10 ug de RNA previamente obtenido fueron tratados con 3U de DNAsa I durante 1 hora a 37° C. La reacción se llevó a cabo en presencia de buffer para DNAsa 1X. Una vez que el RNA quedó libre de DNA se procedió a realizar la transcripción reversa (RT) de acuerdo al protocolo descrito para el kit “GoScript Reverse Transcription System” (Promega). Brevemente, se incubaron 2 ug de RNA con 10 uM de Oligo (dT) 15 a 70° C durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 10 uM de dNTPs, 5 uL de Buffer de RT 5X, 2 uL de transcriptasa reversa, se colocó a 38° C por 60 minutos y finalmente a 4° C∞.

Una vez obtenido el cDNA, este se cuantificó en el equipo EPOCH BIOTEK a 260 nm. Para amplificar la secuencia de nucleótidos que codifican los péptidos de c-ABL que contiene las serinas 16, 638, 878 y 955 y que son los sitios candidatos a ser fosforilados por PAK1, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar 150 nucleótidos río arriba y 150 nucleótidos río arriba del codón que

codifica dichas serinas (tabla I). La amplificación de los fragmentos de interés se realizó empleando la técnica de PCR, usando 50 ng del cDNA previamente obtenido como cadena molde. La reacción se realizó en un volumen de 50 uL y contenía oligonucleótidos a una concentración final de 0.5 uM, 1U de GoTaq DNA polimerasa, 10 uL de buffer 5X y de una mezcla de los 4 dNTPs (0.5 mM de cada uno.) en un volumen final de 50 uL. Las condiciones de la PCR para la amplificación de los sitios S16, S638, S878 y S955 fueron con el siguiente diseño de reacción: 1 paso de desnaturalización inicial de 95° C durante 2 minutos, seguido de un paso de desnaturalización a 95° C durante 60 segundos, alineación a 56° C en el caso de la S16, S638 y S878, en el caso de la S955 se usó una temperatura de alineamiento de 60° C, extensión a 72° C durante 30 segundos, durante 30 ciclos y un paso final de extensión a 72° C por 5 minutos y la reacción se mantuvo a 4° C.

A todos los oligonucleótidos se les adicionaron sitios de restricción para las enzimas BamHI y EcoRI.

POSICIÓN	PRIMER F	PRIMER R	AMPLIFICA
S16	5'-aaaaa <u>ggatcc</u> ggggacc aaagaagg-3'	5'-aaaaa <u>gaattc</u> actgttgactggcgt-3'	Nt 27-391
S638	5'-aaaaa <u>ggatcc</u> ggcggcctgaatgaa-3'	5'-aaaaa <u>gaattc</u> gccgggtggctaggcg-3'	Nt 1821-2233
S878	5'-aaaaa <u>ggatcc</u> gaggaagctgctgat-3'	5'-aaaaa <u>gaattc</u> ctcctggctcgggct-3'	Nt 2331-2728
S955	5'-aaaaa <u>ggatcc</u> gcagtcctggcgca-3'	5'-aaaaa <u>gaattc</u> gccggcctccagcac-3'	Nt 2562-2974

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de nucleótidos que codifican las serinas candidatas a ser fosforiladas por PAK1 S16, S638, S878 y S955, adicionando sitios de corte para las enzimas BamHI y EcoRI para la obtención de un fragmento aproximado de 300 pb.

Para corroborar la amplificación de cada uno de los fragmentos que codifican a sitios candidatos a fosforilación la reacción de PCR se resolvió en un gel de

agarosa al 1% con buffer TBE 0.5 X, teñido con bromuro de etidio para la visualización de la banda en 300 pb. Posteriormente el fragmento se digirió con las enzimas de digestión BamHI y EcoRI.

#### **6.12 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.**

Para clonar los productos amplificados de la PCR esta fue purificada usando el protocolo “GeneJET extraction kit” (Thermo Scientific), con la siguiente estrategia: una vez que el fragmento fue resuelto en el gel de agarosa, se cortó la banda con la ayuda de una navaja estéril libre de DNAsas. La banda que contenía el fragmento de DNA se introdujo en un tubo eppendorf de 1.5 mL y por cada 100 mg de agarosa se adiciono 100 uL de binding buffer; esta mezcla se incubó durante 10 min a 65° C con frecuente inversión. Posteriormente se adiciono 100 uL de isopropanol a la solución con gel solubilizado y se mezcló vigorosamente. Esta mezcla se transfirió a una columna de purificación GeneJET y se centrifugó a 13500 rpm durante 1 minuto. Una vez transcurrido este tiempo la columna se lavó en dos ocasiones con 700 uL de Buffer de lavado y centrifugando a 13500 rpm por 1 minuto con el objetivo de eliminar sales, bromuro de etidio y residuos de agarosa. Finalmente de la columna de purificación se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo y se adiciono 50 uL de buffer de elusión en el centro de la membrana de la columna y se centrifugó durante 1 minuto. La visualización del DNA se realizó en un gel de agarosa al 1%.

#### **6.13 Clonación de c-ABL (S16, S638, S878 y S955) en el vector pGEXP6P3.**

Una vez purificados los fragmentos, estos fueron clonados en el vector de expresión procarionte pGEXP6P3 previamente digerido con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. Se calculó la cantidad de inserto y vector requerida para la reacción de ligación usando la siguiente fórmula:

$$\text{Required insert DNA mass} = \frac{(\text{Insert DNA length})(\text{Vector DNA mass})}{(\text{Vector DNA length})}$$

Para la reacción de ligación se realizó la siguiente mezcla: 100 ng del vector digerido, 300 ng del inserto purificado y digerido, 2 µl de buffer de ligación 10x (PROMEGA®), 3 U de DNA ligasa T4 (PROMEGA®) y agua grado de biología molecular para un volumen final de 20 µl. Esta mezcla se incubó durante 16 horas a una temperatura de 16° C. Se transformaron células competentes *E. coli* de la cepa XL10 GOLD adicionando 4 uL de la mezcla de ligación en 50 uL de bacterias competentes, el protocolo de transformación fue el siguiente: la mezcla de células con la ligación se incubó durante 30 minutos en hielo, posteriormente se dio un choque térmico a una temperatura de 42° C durante 2 minutos e inmediatamente después se colocó la mezcla en hielo por 3 minutos, una vez transcurrido el tiempo se le adiciono a la mezcla 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37° C por 1 hora con agitación a 180 rpm., posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, conservando únicamente el botón de células, el cual fue resuspendido en 100 uL de medio LB sin antibiótico y se colocó en placas de medio LB suplementado con ampicilina (100 ug/mL), finalmente se incubó la placa a 37° C durante toda la noche.

#### **6.14 Determinación de colonias positivas mediante PCR de colonias.**

Para determinar si las colonias bacterianas contenían la construcción deseada, se procedió a realizar una PCR de colonias utilizando los oligonucleótidos específicos, con el siguiente protocolo: se seleccionaron 10 colonias de cada construcción las cuales fueron removidas de la placa con ayuda de una micropunta de 10 uL, se hizo una réplica en otra placa de medio LB suplementada con ampicilina (100 ug/mL), la cual se incubó a 37° C hasta observar crecimiento

bacteriano, lo que restó de la colonia se empleó en la reacción de PCR de colonia. La mezcla estuvo compuesta de oligonucleótidos específicos de c-ABL (Tabla I) 1 uM, 0.25 U GoTaq DNA polimerasa (PROMEGA®), 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 mM de cada uno de los dNTPs bajo las condiciones previamente descritas. Posteriormente los productos amplificados de cada colonia se resolvieron en un gel de agarosa al 1% teñido con de bromuro de etidio.

### **6.15 Obtención de DNA plasmídico.**

De las 10 colonias positivas resultado de la PCR de colonias se colocaron 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 ug/mL) y se incubó a 37° C en agitación de 200 rpm durante 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se procedió con el protocolo de miniprep utilizando el kit GenJeT Plasmid miniprep (Thermo) de la siguiente manera: se resuspendió el pellet previamente obtenido en 250 uL de solución de resuspensión colocando el tubo en vortex para homogenizar, posteriormente se agregaron 250 uL de solución de lisis y se mezcló invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces hasta que la solución se tornó viscosa, se agregaron 350 uL de buffer de neutralización y se mezcló inmediatamente invirtiendo de 4 a 6 veces gentilmente, posteriormente se centrifugó la mezcla a 13500 rpm durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se transfirió el sobrenadante a una columna y se centrifugó durante 1 minuto a 135000 rpm descartando el fluido inferior de la columna. Posteriormente se le adiciono a la columna 500 uL de solución de lavado y se centrifugó durante 60 segundos a 5000 rpm, descartando el fluido inferior de la columna; se repitió este paso adicionando 500 uL de buffer de lavado en cada ocasión, finalmente se centrifugó durante 1 minuto para eliminar el exceso de los lavados anteriores, se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 50 uL de buffer de elusión en el centro de la membrana, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a

13500 rpm durante 2 minutos. Finalmente se descartó la columna y se determinó la integridad del DNA plasmídico migrando 100 ng del mismo en un gel de agarosa al 1%. Cada plásmido obtenido recibió el nombre pGEXP6P3-c-ABL S16, pGEXP6P3-c-ABL S638, pGEXP6P3-c-ABL S878, pGEXP6P3-c-ABL S955.

#### **6.16 Cuantificación de DNA plasmídico.**

La cuantificación del DNA plasmídico se determinó mediante el equipo EPOCH BIOTEK. Se utilizó 1 µl de agua grado biología molecular como blanco y 1 µl de la muestra de plásmido para la medición.

#### **6.17 Digestión de los plásmidos pGEXP6P3-c-ABL S16, pGEXP6P3-c-ABL S638, pGEXP6P3-c-ABL S878, pGEXP6P3-c-ABL S955.**

Para corroborar que la construcción de cada plásmido contenía el fragmento clonado, los vectores candidatos se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, de la siguiente manera: 1 µg de la construcción se digirió con 1U EcoRI, 1U BamHI, 4 uL Buffer Tango 10X en un volumen final De 20 µl, esta mezcla se incubó a 37° C durante 1 hora, se determinó el fragmento liberado migrando la digestión sobre un gel de agarosa al 1%.

#### **6.18 Expresión y purificación de proteínas recombinantes GST-c-ABL-S16, GST-c-ABL-S638, GST-c-ABL-S878 y GST-c-ABL-S955.**

Una vez obtenido el DNA plasmídico se hizo una transformación en cepas de bacterias competente *Escherichia coli* BL-21(DE3) siguiendo el protocolo previamente establecido, la expresión proteica se indujo añadiendo 0.4 Mm de isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para la expresión de las proteínas recombinantes GST-c-ABL-S16, GST-c-ABL-S638, GST-c-ABL-S878 y GST-c-ABL-S955. Se emplea el IPTG debido a que es un análogo de la alolactosa se une

al operón Lac removiendo a los supresores del mismo permitiendo que se dé la transcripción en un tiempo prolongado.

Después de la incubación con IPTG se realizó un lisado celular para obtener las fracciones insolubles, las cuales se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12% para observar la expresión de la proteína recombinante con lo cual se espera una banda de aproximadamente 40 kDa que es el peso de la proteína recombinante. La purificación de la proteína recombinante se realizó como describe Fragoni et al. Brevemente: se añadieron 20 µl de glutatión sefarosa al 50% a cada muestra y se mezcló suavemente durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 100 µl de PBS 1X mezclando en un vórtex brevemente, y la mezcla se centrifugó durante 5 minutos para sedimentar la sefarosa, se retiró el sobrenadante y se repitió este paso de lavado tres veces. Se eluyeron las muestras mediante la adición de 10 µl de glutatión reducido en buffer de elución, se resuspendieron las perlas de sefarosa y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos para recuperar las perlas de sefarosa y se transfirieron los sobrenadantes a tubos eppendorf. Para corroborar que la purificación haya sido correcta se utilizaron alícuotas de 10 µl de cada muestra para migrarlas en SDS-PAGE al 12%, el cual se tiñó con azul de Coomassie para visualizar el vector unido a GST, la banda de GST es de 25 kDa.

### **6.19 Co-inmunoprecipitación de c-ABL y PAK1**

Para determinar si PAK1 y c-ABL interactúan en un contexto celular, se realizó una co-inmunoprecipitación de ambas proteínas empleando la línea celular MDA-MB-231, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, posteriormente se les agregó 50 µL buffer RIPA (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>, PH 7.4 (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1%), desoxicolato de sodio (0.5%), SDS (0.1%), EDTA (5 mM), inhibidor de proteasas (COMPLETE, Roche)]. (1 ml x 10<sup>7</sup> células), se rasparon las células con un gendarme, posteriormente la solución se

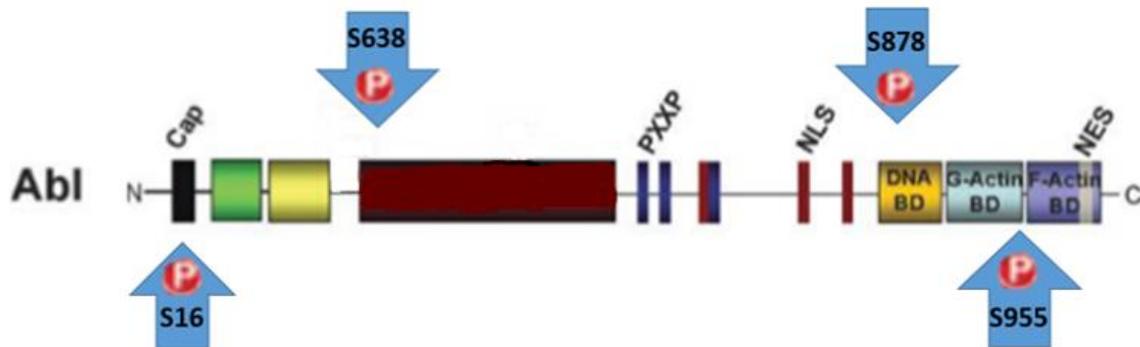
puso a rotar durante 15 minutos a 4° C, una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4° C y se recuperó el sobrenadante, previamente se lavaron 50 uL de perlas acopladas a proteínas G con 1 ml de PBS 1X frío y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se repitió el lavado 3 veces. Posteriormente se usaron 50 uL de perlas y se dejaron interaccionar durante 60 minutos a 4° C (Pre clareo). Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante; se centrifugaron las proteínas totales y se usaron 100 µg de proteínas totales, se adiciono el anticuerpo necesario (250 µL) y se dejó rotando toda la noche a 4°C, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante, se lavó con buffer RIPA pre enfriado (150 µL) en 2 ocasiones y se recolectó el sobrenadante (E1 y E2). Se resuspendió en 100 µL de buffer RIPA y se le adiciono buffer Laemli para resolver en SDS-PAGE.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis *in silico* de la fosforilación de c-ABL mediada por PAK1

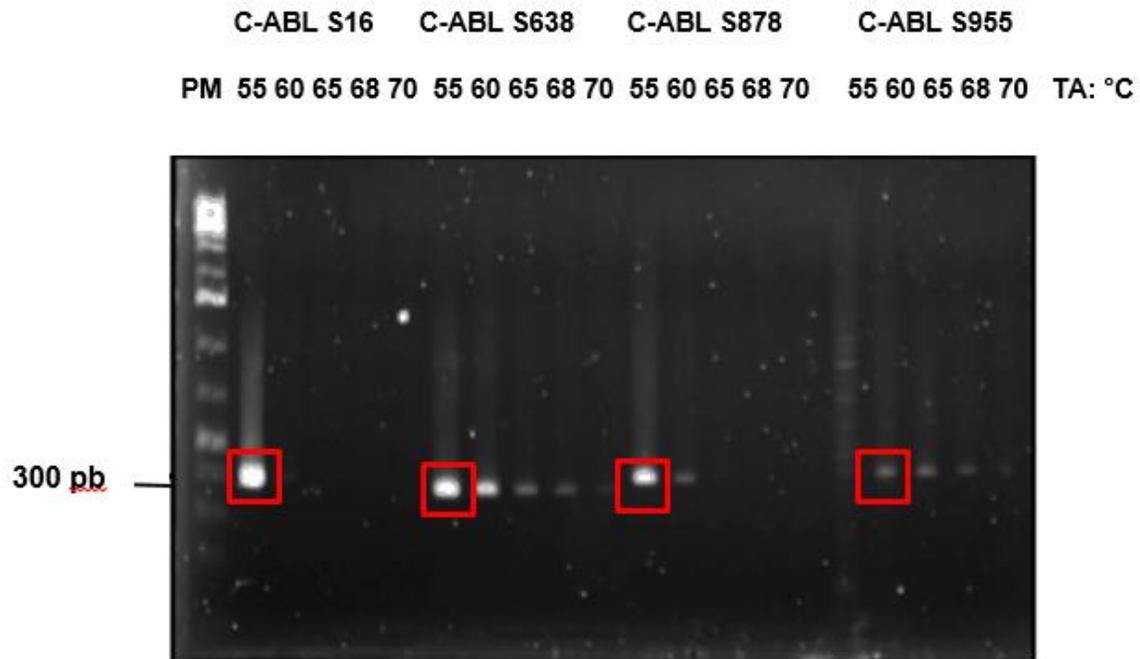
Experimentos empleando microarreglos de fosfo anticuerpos, han mostrado que en células de cáncer de mama ErbB2 positivas y deficientes de PAK1, hay una disminución en la expresión y/o fosforilación de proteínas asociadas a la oncogénesis, como por ejemplo  $\beta$ -catenina, RAF, ERK, FAK, JAK2, y c-ABL entre otras (Arias-Romero *et al.* 2013). Con el fin de determinar cuáles son los sitios consenso de fosforilación de PAK1 en la secuencia primaria de c-ABL con PAK1 se realizó un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de c-ABL obtenida de la base de datos NCBI empleando el software Group-Based Prediction System (GPS) 3.0, los resultados obtenidos permitieron identificar cuatro residuos de serina que potencialmente son sitios de fosforilación de PAK1 en las posiciones S16, S638, S878 y S955 (Figura 6). Una vez obtenidos los sitios consenso de

fosforilación se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de los cuatro fragmentos de DNA con un tamaño aproximado de 300 pb, y que contienen las secuencias que codifican para estas regiones, a estos oligonucleótidos se les adicionaron sitios de restricción para las enzimas BamHI y EcoRI posteriormente se estandarizó la temperatura óptima de alineamiento para cada par de oligonucleótidos (Figura 7).



POSICIÓN	CÓDIGO	CINASA	PÉPTIDO	SCORE	CUTOFF
16	S	PAK1	LGDORRPSLPALHFI	12.205	9.701
638	S	PAK1	PTPPKRSSFREMDG	11.342	9.701
878	S	PAK1	TPTSKAGSGAPGGTS	9.816	9.701
955	S	PAK1	GAKTKATSLVDAVNS	10.474	9.701

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de c-ABL obtenida en la base de datos NCBI y sitios consenso de fosforilación con PAK1 obtenidos por el análisis de software Group-Based Prediction System (GPS) 3.0.



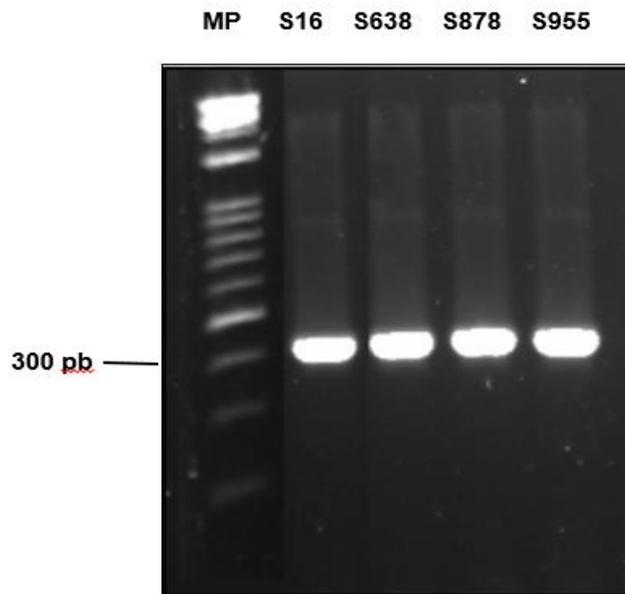
**Figura 7. Amplificación por PCR de cada una de las regiones de c-ABL candidatas a ser fosforiladas.** La parte superior de la figura muestra la estandarización de las temperaturas de alineamiento para la amplificación de un fragmento de 300 pb, dentro del cual se incluye la secuencia que codifica para la S16, S638, S878 y S955. En el primer carril se observa el marcado de peso molecular, mientras que en los carriles siguientes se observa la amplificación de los fragmentos que contienen los sitios candidatos a fosforilación en un gradiente de temperaturas de alineamiento.

## **7.2 Clonación de los fragmentos de c-ABL que contienen los potenciales sitios de fosforilación mediados por PAK1**

Los productos amplificados por PCR se clonaron en el vector de expresión procarionte pGEXP6P3, el cual tiene la característica de generar proteínas fusionadas a GST, este plásmido tiene un cassette de resistencia a ampicilina, un operón Lac que responde a IPTG y un sitio de clonación múltiple con secuencias que reconocen las enzimas BamHI y EcoRI, se ligaron los fragmentos amplificados en el vector con la enzima T4 DNA ligasa para posteriormente hacer

una transformación del mismo en bacterias competentes XL10 GOLD (pGEXP6P3 c-ABL S16, pGEXP6P3 c-ABL S638, pGEXP6P3 c-ABL S878 y pGEXP6P3 c-ABL S955). Se analizaron 10 colonias candidatas a contener cada uno de los vectores generados mediante PCR de colonia empleando los oligonucleótidos previamente diseñados.

Los productos se resolvieron en un gel de agarosa al 1% con el objetivo de identificar a las colonias positivas. Los resultados obtenidos muestran la amplificación de un producto con un peso molecular aproximado de 300 pb que corresponde al tamaño esperado de cada región S16, S638, S878, S955 (Figura 8).



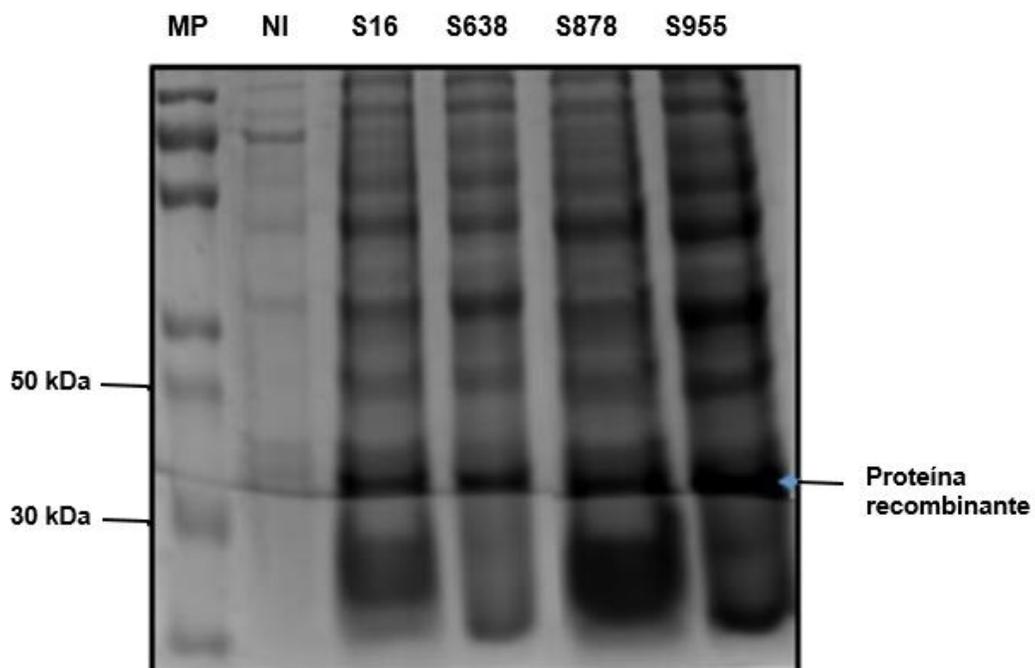
**Figura 8.** Gel de Agarosa al 1% en el cual se resolvieron los productos de PCR obtenidos para la amplificación de secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias candidatas a ser fosforiladas por PAK1 S16, S638, S878 y S955. En el primer carril se visualiza el marcador de peso molecular y en los siguientes carriles se observa el producto amplificado para cada una de las construcciones seleccionadas.

### 7.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

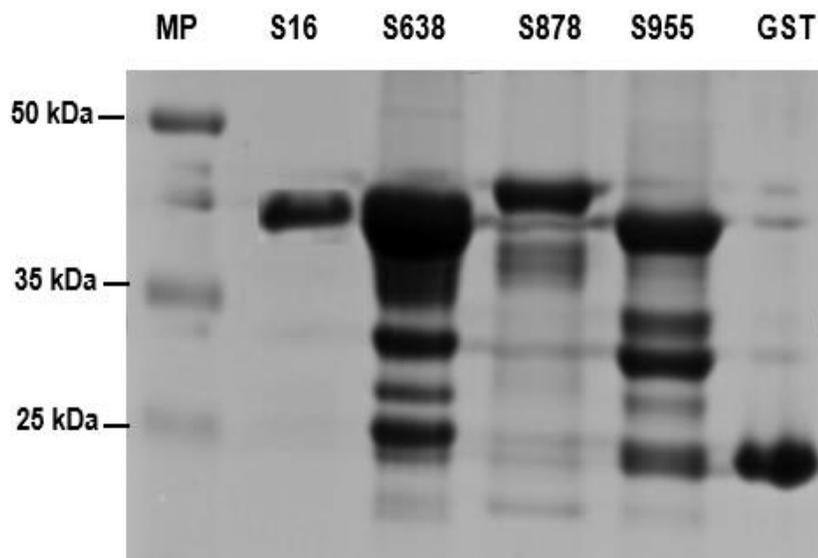
Los plásmidos que contenían los fragmentos de interés se purificaron a partir de las colonias que resultaron positivas a la PCR de colonia empleando el protocolo de miniprep para realizar un lisado celular con el protocolo de miniprep y fueron empleados para transformar bacterias competentes *E.coli* pertenecientes a la cepa BL21 (DE3).

Bacterias transformadas con cada una de las construcciones (pGEXP6P3 c-ABL S16, pGEXP6P3 c-ABL S638, pGEXP6P3 c-ABL S878 y pGEXP6P3 c-ABL S955) fueron cultivadas en LB suplementado con ampicilina y la expresión de las proteínas recombinantes fue inducida con 0.4 mM de IPTG. Las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12% donde se observa el enriquecimiento en la expresión de una proteína con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa (Figura 9).

Posteriormente se realizó la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad (con perlas de Glutathion sefarosa previamente lavadas con PBS), las cuales fueron eluidas de la resina con glutatión reducido y se resolvieron en un gel de poliacrilamida que fue teñido con azul de commassie. En la figura 10 se observa la purificación de los fragmentos que contienen los sitios candidatos de fosforilación, los cuales se visualizan en un peso aproximado de 40 kDa, el cual era el peso esperado. Se observan también bandas de menor peso las cuales podrían corresponder a productos de degradación de la proteína recombinante. Con el propósito de verificar que las proteínas purificadas correspondieran a nuestras proteínas de interés, se realizó una inmunodetección empleando anticuerpos anti-GST y se detectaron bandas de aproximadamente 40 kDa correspondientes a cada una de las regiones candidatas a ser fosforiladas por PAK1. También se purificó GST para ser utilizada como control negativo en el ensayo de cinasa *in vitro*.



**Figura 9. Expresión de las proteínas recombinantes en los extractos de bacterias inducidas con IPTG.** En el primer carril se observan los marcadores de peso (MP), en el segundo carril los extractos de bacterias no inducidas (NI) de las cuales no se observa la expresión de la proteína recombinante y del tercero al sexto carril se observan los extractos de bacterias transformadas para cada región e inducidas con IPTG (GST- c-ABL-S16, GST-c-ABL- S638, GST-c-ABL- S878 y GST-c-ABL-S955).



**Figura 10. Purificación de las proteínas recombinantes que contienen los potenciales sitios de fosforilación mediados por PAK1.** Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de comassie, en el cual se observa la purificación por cromatografía de afinidad de los fragmentos que contenían los sitios candidatos a ser fosforilados por PAK1.

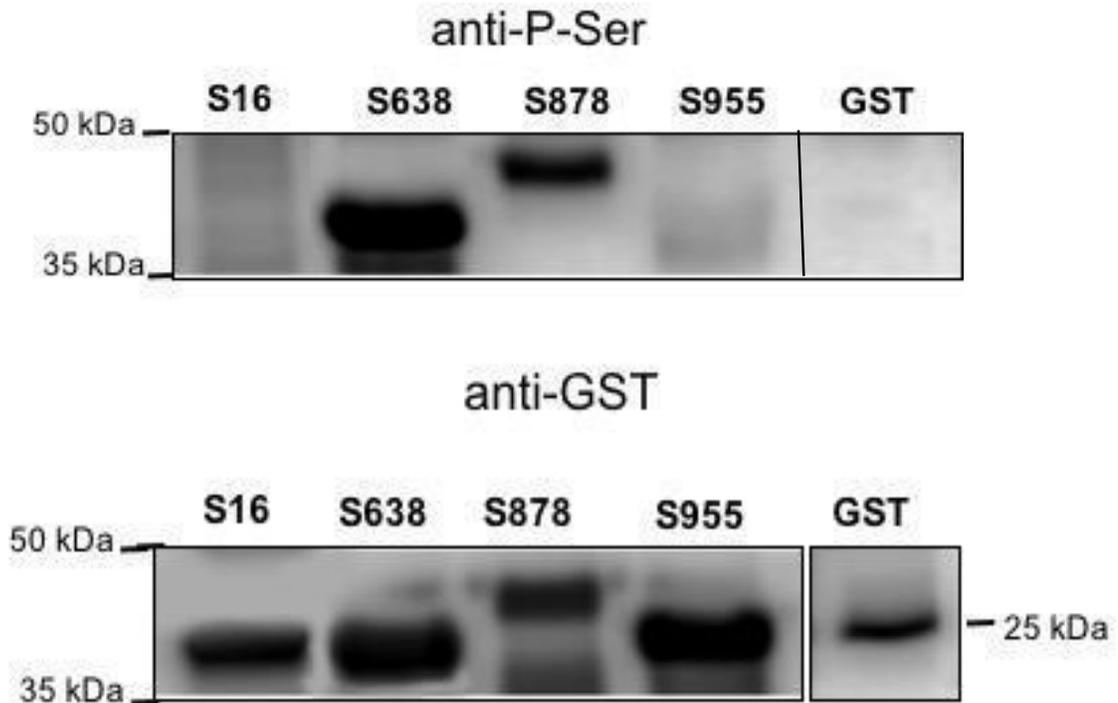
#### **7.4 PAK1 fosforila a c-ABL en los residuos de Serina 638 y 878 *in vitro***

Para demostrar si c-ABL, es un sustrato directo de PAK1 se realizó un ensayo de cinasa *in vitro* con las proteínas recombinantes previamente obtenidas.

Cada una de las proteínas recombinantes que contienen el potencial sitios de fosforilación mediado por PAK1, fue incubada con esta cinasa en presencia de ATP, y como control negativo se empleó a GST en presencia de PAK1.

La fosforilación de los potenciales sustratos fue determinada mediante Western blot empleando un anticuerpo policlonal que detecta residuos de serina fosforilados. En la figura 11 se muestra un Western blot representativo de tres ensayos hechos, en él se observa que las proteínas recombinantes que contienen los residuos de aminoácidos S638 y S878 de c-ABL son fosforilados por PAK1

mientras que los fragmentos S16 y S955 no muestran fosforilación. Como era esperado, en el carril de GST no se observa fosforilación. Este resultado apoya las observaciones de estudios previos que reportan la fosforilación de c-ABL por otro miembro de la familia de PAK.



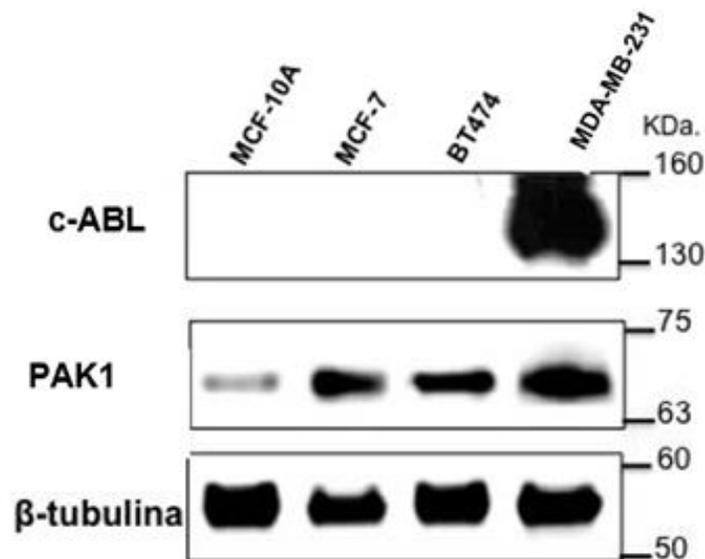
**Figura 11. Ensayo de cinasa *in vitro* de los residuos candidatos a ser fosforilados por PAK1.** Imagen representativa de un Western blot empleando un anticuerpo policlonal que detecta residuos de serinas fosforiladas. En el primer carril se observa que la S16 no presenta fosforilación, en el segundo carril se observa la fosforilación de la S638, en el tercer carril se observa la fosforilación de la S878, en el cuarto carril se observa que la S955 no presenta fosforilación y en el quinto carril se observa GST no fosforilado como control negativo.

### **7.5 Las proteínas PAK1 y c-ABL se encuentran sobreexpresadas en líneas celulares de cáncer de mama**

Para determinar si las proteínas PAK1 y c-ABL se encuentran sobreexpresadas en líneas celulares de cáncer de mama se obtuvieron extractos proteicos de las

líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y BT474, y de la línea celular de epitelio de glándula mamaria no transformada MCF-10A como control de los niveles de expresión basal de ambas proteínas en células no cancerosas. Las proteínas totales de las cuatro líneas celulares fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y transferidas a membranas de PVDF para determinar la expresión de las proteínas de interés mediante Western blot.

Los resultados del experimento mostraron que en las líneas celulares de cáncer de mama la expresión de PAK1 es mucho mayor en comparación con la línea celular no transformada, y entre las líneas celulares de cáncer de mama, la que presenta los mayores niveles de expresión de PAK1 es MDA-MB-231, la cual es considerada la más agresiva de las tres que se emplearon. Respecto a la expresión de c-ABL, no se detectó su expresión en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 ni en BT-474; y únicamente se observaron niveles altos de expresión en la línea celular MDA-MB-231.

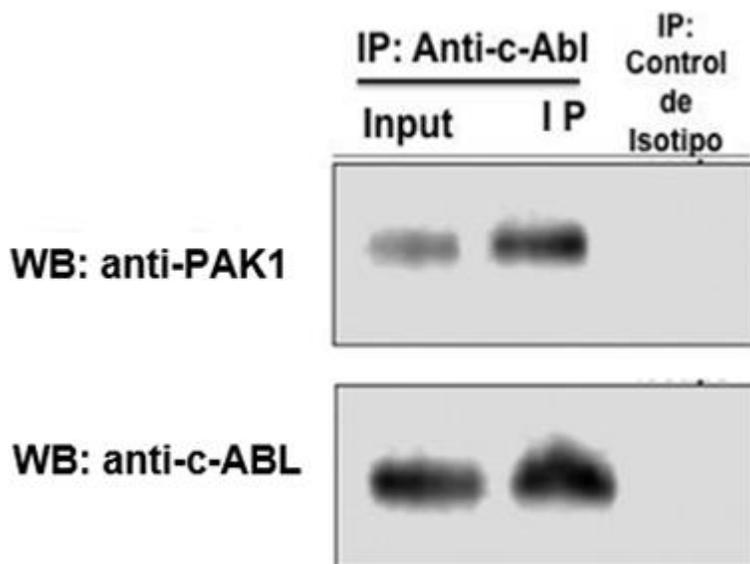


**Figura 12. Niveles de expresión de PAK1 y c-ABL en distintas líneas celulares de cáncer de mama.** Western blot de expresión de PAK1 y c-ABL en líneas celulares de cáncer de mama empleando un anticuerpo anti PAK1 total y anti c-ABL total. El panel superior muestra los niveles

de expresión de c-ABL en la línea celular de epitelio no transformado MCF-10A, y en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, BT474 y MDA-MB-231. El panel medio muestra la expresión de PAK1, y el panel inferior la expresión de  $\beta$ -tubulina que fue empleado como control de carga.

### 7.6 PAK1 y c-ABL interactúan directamente *in vitro*

Con el objetivo de determinar si PAK1 y c-ABL interactúan en un contexto celular, se empleó la línea celular MDA-MB-231. Las células fueron lisadas y se efectuó la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas empleando anticuerpos anti-PAK1 y realizando un Western blot con anticuerpos anti-c-ABL. Paralelamente se realizó el experimento inverso, inmunoprecipitando ambas proteínas con un anticuerpo anti-c-ABL y realizando el Western blot empleando anticuerpos anti-PAK1. Los resultados obtenidos confirman que PAK1 interactúa físicamente con c-ABL en células de cáncer de mama (Figura 13).



**Figura 13. Interacción de PAK1 y c-ABL en un contexto celular.** Western blot de co-inmunoprecipitación de PAK1 y c-ABL, empleando un anticuerpo anti-c-ABL para inmunoprecipitar y un anticuerpo anti-PAK1 para revelar. En el panel superior se observa en el primer carril el input y en el segundo se observa la co-inmunoprecipitación de PAK1, pero no en el carril del control de

isotipo. En el panel inferior se observa la presencia de c-ABL tanto en el input como en la co-inmunoprecipitación, pero no en el carril del control de isotipo.

## 8. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad compleja que comprende múltiples aspectos morfológicos, moleculares y clínicos (Weigelt *et al.*, 2009). La heterogeneidad del cáncer de mama no se puede explicar únicamente por parámetros clínicos como el tamaño del tumor, afección ganglionar y grado histológico ya que durante las últimas décadas la investigación ha profundizado en la biología molecular de esta enfermedad, identificando la interconexión de varias vías de señalización las cuales influyen en la fisiopatología de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos (Eroles *et al.*, 2012).

Actualmente los tratamientos empleados contra esta enfermedad se basan en ensayos clínicos aleatorios de poblaciones Estadounidenses y Europeas principalmente, lo cual resulta conflictivo ya que no se toman en cuenta las poblaciones mundiales, disminuyendo así la efectividad de los tratamientos dirigidos hacia otras poblaciones (Eroles *et al.*, 2012). Por ello es sumamente importante identificar nuevos blancos terapéuticos cuya actividad sea relevante durante el inicio y/o progresión del cáncer. Un ejemplo es la proteína cinasa PAK1, la cual se encuentra frecuentemente sobreexpresada y/o amplificada en cáncer de mama y se ha asociado con una mayor invasividad y supervivencia de células cancerosas (Dummler *et al.*, 2009), además de que aproximadamente el 50% de los tumores de mama humanos presentan sobreexpresión e hiperactivación de PAK1 lo cual promueve la formación y progresión de tumores malignos (Balasenthil *et al.*, 2004).

Adicionalmente, en trabajos en los que se han empleado líneas celulares como modelo de estudio, se ha observado que la expresión ectópica de una forma constitutivamente activa de PAK1 (T423E) induce efectos fenotípicos característicos de una célula cancerosa como aumento en la motilidad celular, crecimiento independiente de anclaje y resistencia a la apoptosis (Dummler *et al.*, 2009); mientras que la expresión de una mutante catalíticamente inactiva de PAK1 (K299R) en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-435 y MDA-MB-231 redujo de manera significativa su potencial invasivo (Adam *et al.* 2000).

Con el propósito de estudiar de una manera detallada los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del cáncer de mama, recientemente se han generado sistemas de cultivo en 3 dimensiones (3D) que recapitulan el desarrollo de los ductos de la glándula mamaria, empleando la línea celular de epitelio no transformado MCF-10A, y las llamadas líneas de progresión serial MCF-10A NeoT, MCF-10AT1 y MCF-10 DCIS que recapitulan el desarrollo de estadios más avanzados del carcinoma ductal *in situ*. Estos sistemas ofrecen la ventaja de poder ser manipulados genéticamente y de poder ser analizados bioquímica y celularmente por técnicas convencionales como por ejemplo inmunofluorescencia y western blot. Además de que cuando se sobreexpresa algún oncogén en la línea no transformada MCF10A, las estructuras 3D muestran características similares a las del carcinoma ductal *in situ*, como son pérdida de la polaridad y de los contactos célula-célula, inhibición de la apoptosis e incremento de la proliferación celular (Shaw, K.R. *et al.*, 2004).

Empleando estos sistemas 3D con las líneas MCF10A de progresión serial, se evaluó la actividad de PAK1 y se observó que los niveles de expresión y activación de esta enzima aumentaron en las líneas más malignas en comparación con la línea no transformada, mientras que la inhibición de PAK1 redujo tanto la migración como la proliferación celular en tres dimensiones (3D), lo que indica que PAK1 tiene un papel importante en las primeras etapas de transformación celular (Li *et al.*, 2008).

Adicionalmente, Wang y colaboradores en el 2006 reportaron que en un modelo transgénico de ratón que expresa una forma mutante de PAK1 constitutivamente activa (T423E) bajo el control de un promotor específico de glándula mamaria, se desarrollaron tumores mamarios malignos, así como otras lesiones mamarias como nódulos sólidos, hiperplasia ductal, neoplasia y adenoma, además de que la sobreexpresión de PAK1 promueve la activación de MEK1/2 y p38 MAPK en células epiteliales de tumor mamario. Este conjunto de hallazgos proporcionan evidencia directa de que la desregulación de PAK1 es importante para la formación y progresión de tumores de mama.

Posteriormente, Arias-Romero y colaboradores en el 2013, estudiaron el mecanismo molecular por el cual las dos isoformas de las PAK del grupo I que se expresan en la glándula mamaria, PAK1 y PAK2, participan durante el inicio de la transformación celular empleando modelos celulares y animales de cáncer de mama ErbB2 positivo, y se observó que la inhibición de PAK1 pero no de PAK2 impide la transformación por ErbB2 en cultivos tridimensionales (3D), y que en los modelos animales deficientes de PAK1, y que expresan a Neu (el homólogo a ErbB2 en rata) en las células epiteliales de la glándula mamaria, se desarrollan tumores más tardíamente que los ratones Neu positivos que sí expresan a PAK1; a través de la activación de  $\beta$ -catenina y la posterior expresión de sus genes blanco. De manera interesante, también se observó que en las células deficientes de PAK1 hay una hipofosforilación de distintas moléculas señalizadoras que son importantes en el desarrollo y progresión de distintos tipos de tumores, como por ejemplo, JAK2, Src, FAK, RAF y la proteína tirosina cinasa de tipo no receptor c-ABL que fue el objeto de este trabajo. Esta cinasa es importante durante el crecimiento y desarrollo en condiciones normales, y la alteración en su actividad ha sido asociada a una variedad de patologías entre ellas el cáncer (Ganguly & Plattner, 2012); ya que diversos estudios han establecido que en algunos tumores sólidos como el de mama se encuentra sobreexpresada, promoviendo la proliferación celular, el crecimiento independiente de anclaje y la sobrevivencia

celular (Srinivasan & Plattner, 2006). De manera interesante, y de relevancia para este trabajo de tesis, es el hecho de que algunos estudios previos han reportado la fosforilación de c-ABL mediada por PAK2 en las posiciones S637 y S638, sin embargo el papel de esta asociación y su significado biológico no se ha definido (Roig *et al.*, 2000).

Con el propósito de determinar si la proteína c-ABL es un potencial sustrato de PAK1, se realizó un análisis bioinformático, en el cual se evaluó si c-ABL posee sitios consenso de fosforilación mediados por PAK1. El resultado de este análisis *in silico*, arrojó que existen cuatro residuos de Serina en las posiciones 16, 638, 878 y 955 que potencialmente podrían ser fosforilados por PAK1; y de entre estos sitios, se ha comprobado que PAK2 fosforila directamente a la Serina 638 (Roig *et al.*, 2000). El siguiente paso fue evaluar mediante ensayos de cinasa *in vitro* si c-ABL es fosforilada por PAK1, los resultados obtenidos mostraron que las Serinas en las posiciones 638 y 878 son efectivamente fosforilados por esta cinasa. Hasta la fecha, no existen reportes del efecto de la fosforilación de esos residuos en la actividad o función de c-ABL, sin embargo, el papel de estas modificaciones post-traduccionales podría resultar crucial en la transición epitelio mesénquima (pérdida de polaridad celular y contacto celular) y consecuentemente en los procesos de migración e invasión ya que se ha demostrado que c-ABL está asociada con la remodelación del citoesqueleto de actina (Kadlec & Pendergast., 1997). De igual forma es importante mencionar que el residuo de Serina en la posición 878 se encuentra en la región de unión a DNA de c-ABL, lo que podría ser relevante para su función de unión al DNA y arresto del ciclo celular en la fase G1 cuando existe daño en el material genético, o bien durante la inducción de la apoptosis (Ganguly & Plattner, 2012).

Una vez establecida la asociación física y fosforilación de c-ABL mediada por PAK1 *in vitro*, se procedió a determinar si ambas proteínas interactúan en un contexto celular. Para esto, en primer lugar se determinaron los niveles de expresión de ambas proteínas mediante Western blot en la línea celular de epitelio

mamario no transformado MCF-10A y en las líneas celulares cáncer de mama MDA-MB-231, MCF-7 y BT474. Nuestros resultados mostraron que la proteína PAK1 se encuentra sobreexpresada en líneas celulares derivadas de tumores de cáncer de mama en comparación con la línea celular de epitelio mamario no transformado en las hay una baja expresión de la proteína, lo que concuerda con el estudio de Holm y colaboradores (2006) en el cual se hizo un análisis de la expresión de PAK1 en tejido tumoral contra tejido sano y se observó la sobreexpresión de PAK1 en tejido tumoral en contraste con el tejido sano, de igual forma se observó que la expresión de PAK1 está asociada con varias características agresivas en los tumores de mama como alto nivel de proliferación; de manera paralela Ong y colaboradores (2011) reportaron mediante inmunohistoquímica una baja expresión de PAK1 en tejido de mama normal adyacente al tumor, en comparación con el tejido tumoral; y de igual forma se observó la amplificación y/o sobreexpresión de PAK1 tanto a nivel de mRNA como de proteína en distintas líneas celulares de cáncer de mama.

Con respecto a la expresión de c-ABL, únicamente se detectó un alto nivel de expresión en la línea celular MDA-MB-231, mientras que en las otras líneas celulares empleadas no observamos expresión. Estos resultados contrastan con estudios previos, en los que se ha reportado la hiperactividad de c-ABL en algunas líneas celulares de cáncer de mama, como MDA-MB-231, MCF-7 y BT474. Sin embargo, en ese estudio también se observaron niveles de expresión de c-ABL mucho más altos en el caso de la línea celular triple negativa MDA-MB-231 en comparación con las otras dos líneas celulares (Ganguly & Plattner, 2012), lo que sugiere que el aumento en los niveles de expresión de c-ABL correlacionan con el nivel de malignidad de la línea celular.

Finalmente, se procedió a determinar si en la línea celular MDA-MB-231, en la cual se expresan altos niveles de ambas proteínas, estas interactúan físicamente a través de la realización de un ensayo de co-inmunoprecipitación, en el cual observamos la asociación de PAK1 y c-ABL en un contexto celular. Estos

resultados en conjunto muestran que PAK1 es capaz de unirse y posiblemente fosforilar c-ABL *in vivo*, sin embargo, por el momento no es posible determinar si esto ocurre debido a que no existen anticuerpos que reconozcan específicamente la fosforilación de los residuos de c-ABL identificados como blanco de PAK1 en este trabajo. Además, se demuestra que potencialmente c-ABL es un sustrato de más de un miembro de la familia de proteínas PAK, apoyando así la idea de que esta enzima es una proteína multifuncional que puede interactuar con una amplia gama de moléculas implicadas en los procesos de transformación celular y progresión del cáncer. El papel de la fosforilación de c-ABL mediado por PAK1, será objeto de estudios futuros, sin embargo, los antecedentes publicados por Roig (2000) describen que la interacción entre PAK2 y c-ABL incrementa la actividad de tirosina cinasa de c-ABL, y que a su vez ésta fosforila a PAK2 regulándola negativamente, sugiriendo la existencia de un bucle de retroalimentación negativa entre c-ABL y PAK2.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo abren la posibilidad de explorar en un futuro si c-ABL y PAK1 pueden ser buenos blancos terapéuticos en modelos celulares y animales de cáncer de mama, sin embargo, se necesita un análisis de las vías de señalización reguladas por la activación de estas cinasas. Dado que varios inhibidores de c-ABL están ahora disponibles para su uso clínico, y que inhibidores de PAK1 han llegado a estudios clínicos de fase I, resultaría interesante evaluar si la inhibición combinada de ambas moléculas es más efectiva que la monoterapia, y cuál es el efecto de la inhibición de estas moléculas en los procesos celulares implicados durante el proceso de transformación celular y progresión tumoral.

## 9. CONCLUSIONES

La proteína c-ABL es un sustrato directo de PAK1, y es fosforilada *in vitro* en los residuos de Serina en las posiciones 638 y S878.

Las proteínas PAK1 y c-ABL se encuentran sobreexpresadas en distintas líneas celulares de cáncer de mama.

Las proteínas c-ABL y PAK1 interactúan físicamente en un contexto celular.

## 10. PERSPECTIVAS

Determinar si PAK1 es capaz de unirse y fosforilar a c-ABL *in vivo*.

Inducir la sobreexpresión de PAK1 y c-ABL en líneas celulares de epitelio mamario no transformado y evaluar los procesos biológicos que se ven afectados.

Emplear inhibidores farmacológicos de PAK1 y c-ABL, de manera independiente y en conjunto para evaluar los procesos celulares que se ven afectados.

Caracterizar la función biológica de la fosforilación en las serinas 638 y 878 de c-ABL en líneas celulares.

Evaluar el papel de la fosforilación de c-ABL mediada por PAK1 en la actividad de c-ABL.

## 11. LITERATURA CITADA

- Adam, L., Vadlamudi, R., Mandal, M., Chernoff, J., and Kumar, R. (2000). Regulation of Microfilament Reorganization and Invasiveness of Breast Cancer Cells by Kinase Dead p21-activated Kinase-1. *J. Biol. Chem.* 275, 12041–12050.
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., de Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., and Piccart, M. (2014). Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J. Clin. Oncol.* 32, 2794–2803.
- Akinkuolie, A. A., Etonyeaku, A. C., Olasehinde, O., Arowolo, O. A., & Babalola, R. N. (2016). Breast cancer patients' presentation for oncological treatment: a single centre study. *Pan African Medical Journal*, 24(1).
- Arias-Romero, L. E., & Chernoff, J. (2008). A tale of two Paks. *Biology of the Cell*, 100(2), 97-108.
- Arias-Romero, L. E., Villamar-Cruz, O., Huang, M., Hoeflich, K. P., & Chernoff, J. (2013). Pak1 kinase links ErbB2 to  $\beta$ -catenin in transformation of breast epithelial cells. *Cancer research*, 73(12), 3671-3682.
- Balasesenthil, S., Sahin, A.A., Barnes, C.J., Wang, R.-A., Pestell, R.G., Vadlamudi, R.K., and Kumar, R. (2004). p21-activated Kinase-1 Signaling Mediates Cyclin D1 Expression in Mammary Epithelial and Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 1422–1428.
- Bianchini, G., Balko, J.M., Mayer, I.A., Sanders, M.E., and Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 674–690.
- Bishop, J. M., & Weinberg, R. A. (1996). *Scientific American molecular oncology*. New York: Scientific American.

Blackwell, K.L., Burstein, H.J., Storniolo, A.M., Rugo, H., Sledge, G., Koehler, M., Ellis, C., Casey, M., Vukelja, S., Bischoff, J., et al. (2010). Randomized Study of Lapatinib Alone or in Combination With Trastuzumab in Women With ErbB2-Positive, Trastuzumab-Refractory Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 1124–1130.

Burotto, M., Chiou, V.L., Lee, J.-M., and Kohn, E.C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer* 120, 3446–3456.

Callow MG, Clairvoyant F, Zhu S, Schryver B, Whyte DB, Bischoff JR, et al. Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. *J Biol Chem.* 2002; 277:550–558.

Cheang, M.C.U., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., and Nielsen, T.O. (2008). Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res* 14, 1368–1376.

Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R. C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *The lancet oncology*, 8(3), 235-244.

Cowherd, S. M. (2012). Tumor staging and grading: a primer. *Molecular Profiling: Methods and Protocols*, 1-18.

Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, 5(10), 2929.

Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905–2927.

Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R., and Field, J. (2009). Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 51–63.

Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* 38, 698–707.

Ganguly, S.S., and Plattner, R. (2012). Activation of Abl Family Kinases in Solid Tumors. *Genes Cancer* 3, 414–425.

Graus-Porta, D., et al., ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, 1997. 16(7): p. 1647-55.

Greuber, Emileigh K., Pameeka Smith-Pearson, Jun Wang, and Ann Marie Pendergast. 2013. “Role of ABL Family Kinases in Cancer: From Leukaemia to Solid Tumours.” *Nature Reviews. Cancer* 13 (8): 559–71. doi:10.1038/nrc3563.

Hagemeyer, Anne, and Carlos Graux. 2010. “ABL1 Rearrangements in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Genes, Chromosomes & Cancer* 49 (4): 299–308. doi:10.1002/gcc.20743.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Hantschel, O. (2012). Structure, Regulation, Signaling, and Targeting of Abl Kinases in Cancer. *Genes Cancer* 3, 436–446.

Heng, Y. J., Lester, S. C., Tse, G. M., Factor, R. E., Allison, K. H., Collins, L. C., ... & Punjabi, R. (2017). The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes. *The Journal of pathology*, 241(3), 375-391.

Holm, Caroline, Suresh Rayala, Karin Jirstrom, Olle Stål, Rakesh Kumar, and Göran Landberg. 2006. “Association between Pak1 Expression and Subcellular Localization and Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Patients.” *Journal of the National Cancer Institute* 98 (10): 671–80. doi:10.1093/jnci/djj185.

Jaffer, Z.M., and Chernoff, J. (2002). p21-Activated kinases: three more join the Pak. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 713–717.

Kadlec, L., & Pendergast, A. M. (1997). The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase and may play a role in cytoskeletal regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23).

- Kamdje, A. H. N., Etet, P. F. S., Vecchio, L., Muller, J. M., Krampera, M., & Lukong, K. E. (2014). Signaling pathways in breast cancer: therapeutic targeting of the microenvironment. *Cellular signalling*, *26*(12), 2843-2856.
- Khatiri, A., Wang, J., & Pendergast, A. M. (2016). Multifunctional Abl kinases in health and disease. *J Cell Sci*, *129*(1), 9-16.
- Krause, D. S., & Van Etten, R. A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine*, *353*(2), 172-187.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* *121*, 2750–2767.
- Li, Q., Mullins, S.R., Sloane, B.F., and Mattingly, R.R. (2008). p21-Activated kinase 1 coordinates aberrant cell survival and pericellular proteolysis in a three-dimensional culture model for premalignant progression of human breast cancer. *Neoplasia* *10*, 314–329.
- Liu, Y., Chen, N., Cui, X., Zheng, X., Deng, L., Price, S., Karantza, V., and Minden, A. (2010). The protein kinase Pak4 disrupts mammary acinar architecture and promotes mammary tumorigenesis. *Oncogene* *29*, 5883–5894.
- Menard, R. E., Jovanovski, A. P., & Mattingly, R. R. (2005). Active p21-activated kinase 1 rescues MCF10A breast epithelial cells from undergoing anoikis. *Neoplasia*, *7*(7), 638-645.
- Morrison, C.D., Chang, J.C., Keri, R.A., and Schiemann, W.P. (2017). Mutant p53 dictates the oncogenic activity of c-Abl in triple-negative breast cancers. *Cell Death Dis* *8*, e2899.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI. 2017). Recuperado de [[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_005148.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_005148.2)]. Consultado 08/08/17.
- Ong, C.C., Jubb, A.M., Haverty, P.M., Zhou, W., Tran, V., Truong, T., Turley, H., O'Brien, T., Vucic, D., Harris, A.L., et al. (2011). Targeting p21-activated kinase 1

(PAK1) to induce apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7177–7182.

Ormandy, Christopher J., Elizabeth A. Musgrove, Rina Hui, Roger J. Daly, and Robert L. Sutherland. 2003. “Cyclin D1, EMS1 and 11q13 Amplification in Breast Cancer.” *Breast Cancer Research and Treatment* 78 (3): 323–35. doi:10.1023/A:1023033708204.

Porta, C., Paglino, C., and Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* 4.

Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., and Chernoff, J. (2014). Pak Signaling in the Development and Progression of Cancer. *Nat Rev Cancer* 14, 13–25.

Rayala, Suresh K., and Rakesh Kumar. 2007. “Sliding p21-Activated Kinase 1 to Nucleus Impacts Tamoxifen Sensitivity.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61 (7): 408–11. doi:10.1016/j.biopha.2007.05.006.

Rennefahrt, U. E., Deacon, S. W., Parker, S. A., Devarajan, K., Beeser, A., Chernoff, J., & Peterson, J. R. (2007). Specificity profiling of Pak kinases allows identification of novel phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15667-15678.

Révillion, F., Bonnetterre, J., and Peyrat, J.P. (1998). ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *European Journal of Cancer* 34, 791–808.

Roig, J., Tuazon, P. T., Zipfel, P. A., Pendergast, A. M., & Traugh, J. A. (2000). Functional interaction between c-Abl and the p21-activated protein kinase  $\gamma$ -PAK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14346-14351.

Santen, R.J., Song, R.X., McPherson, R., Kumar, R., Adam, L., Jeng, M.-H., and Yue, W. (2002). The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80, 239–256.

Shah, S.P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., Turashvili, G., Ding, J., Tse, K., Haffari, G., et al. (2012). The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple negative breast cancers. *Nature* 486.

Shaw, K.R.M., Wrobel, C.N., and Brugge, J.S. (2004). Use of Three-Dimensional Basement Membrane Cultures to Model Oncogene-Induced Changes in Mammary Epithelial Morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 297–310.

Shaw, R.J., and Cantley, L.C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424–430.

Sirvent, A., Benistant, C., and Roche, S. (2008). Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biology of the Cell* 100, 617–631.

Srinivasan, D., and Plattner, R. (2006). Activation of Abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 5648–5655.

Tharakan, R., Lepont, P., Singleton, D., Kumar, R., and Khan, S. (2008). Phosphorylation of estrogen receptor alpha, serine residue 305 enhances activity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 295, 70–78.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.

Vadlamudi, R. K., Adam, L., Wang, R. A., Mandal, M., Nguyen, D., Sahin, A., & Kumar, R. (2000). Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 36238-36244.

Villarreal-Garza, C., Mohar, A., Bargallo-Rocha, J. E., Lasa-Gonsebatt, F., Reynoso-Noverón, N., Matus-Santos, J., & Ramírez-Ugalde, M. T. (2017). Molecular subtypes and prognosis in young Mexican women with breast cancer. *Clinical breast cancer*, 17(3), e95-e102.

Wang, R. A., Zhang, H., Balasenthil, S., Medina, D., & Kumar, R. (2006). PAK1 hyperactivation is sufficient for mammary gland tumor formation. *Oncogene*, 25(20), 2931.

Weigelt, B., and Reis-Filho, J.S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 6, 718–730.

World Health Organization (OMS. 2017). Recuperado de [<http://www.who.int/topics/cancer/es/>]. Consultado 21/08/17.

Yang, S.-H., Sharrocks, A.D., and Whitmarsh, A.J. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 513, 1–13.

Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, 5(3), 412-424.

Zhao, Z., and Manser, E. (2012). PAK family kinases. *Cell Logist* 2, 59–68.

## 12. ANEXO

### SOLUCIONES

- Buffer de transferencia 1X

Reactivo	Concentración	Volumen (1000 ml)
Tris	50 mM	5.8 gr
Glicina	380 mM	29 gr
SDS	0.1%	1.0 gr
Metanol	20%	200 ml
H <sub>2</sub> O destilada	20%	764.2 ml

- Buffer de corrida Laemmli 10X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Tris	30.3 gr
Glicina	144.2 gr
SDS	10 gr

NOTA: Disolver en 800ml de agua destilada y aforar a 1 LT, posteriormente ajustar pH 8.3 y almacenar a temperatura ambiente.

- Buffer TBE 50X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Tris	540 gr
Ácido bórico	275 gr
EDTA 0.5 M pH 8	200 ml

NOTA: Añadir el TRIS con 600 ml de agua destilada, una vez disuelto agregar el ácido bórico y el EDTA, posteriormente aforar a 1 LT y esterilizar 20 minutos en autoclave, almacenar a temperatura ambiente.

- Buffer TAE 50X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Tris	242 gr
Ácido acético glacial	57.1 gr

EDTA 0.5 M pH 8	100 ml
-----------------	--------

NOTA: Añadir el TRIS en 600ml de agua destilada, una vez disuelto, agregar el ácido acético y el EDTA, aforar a 1 LT y almacenar a temperatura ambiente.

- Rojo de Ponceau

Reactivo	Volumen (100 ml)
Ponceau	0.5 gr
Ácido acético	1 ml

NOTA: Aforar con 100 ml de agua destilada.

- Azul de Coomassie

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Etanol 96°	450 ml
Ácido acético glacial	50 ml
Azul de coomassie	2.5 gr
H <sub>2</sub> O destilada	500 ml

NOTA: Mezclar agua y etanol, posteriormente ácido acético finalmente añadir azul de coomassie, dejar en agitación toda la noche y almacenar en frasco ámbar.

- Solución desteñidora

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Metanol	400 ml
Ácido acético glacial	50 ml
H <sub>2</sub> O destilada	550 ml

- Medio LB

Reactivo	Volumen (1000 ml)
Triptona	10 gr
Yeast extract	5 gr
NaCl	10 gr
H <sub>2</sub> O destilada	975 ml

- Buffer de cinasa 10X

Reactivo	Volumen (1 ml)
HEPES 1M	400 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 1M	100 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O destilada	500 $\mu$ L

- PBS 10X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
NaCl	80 gr
KCl	2.0 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	11.5 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 gr

NOTA: Aforar a 1 LT con agua destilada y esterilizar en autoclave.

- TBS 10X

Reactivo	Volumen (1000 ml)
NaCl	88 gr
Tris	24gr
H <sub>2</sub> O destilada	990 ml

NOTA: Ajustar pH a 7.6

- TBS-0.1% TWEEN

Reactivo	Volumen (1000 ml)
TBS 10X	100 ml
H <sub>2</sub> O destilada	900 ml
Tween 20	1 ml

- Bis acrilamida 0.8%

Reactivo	Volumen (100 ml)
Acrilamida	30 gr

Bis acrilamida	0.8 gr
H <sub>2</sub> O destilada	69.2 ml

- Buffer RIPA

Reactivo	Concentración
Tris HCl, pH 8.0	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1%
Deoxicolato de sodio	0.5%
SDS	0.1%